

**Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. M. Flentje**

**Induktion und Reparatur von DNS-Schäden im Comet-Assay,
klonogene Überlebensrate und Mikrokernfrequenz
von humanen Zellen unterschiedlicher Herkunft
nach Röntgenbestrahlung in vitro**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von**

**Birgit Müller
aus Paderborn**

Würzburg, Januar 2005

Referenten

Referent: Prof. Dr. med. M. Flentje
Koreferentin: Prof. Dr. rer. nat. H. Stopper
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2006

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Strahlennebenwirkungen - ein entscheidendes Problem der Strahlentherapie.....	1
1.2	Zelluläre Wirkungen ionisierender Strahlung	2
1.3	Prädiktive Testverfahren	4
1.4	Fragestellung der Arbeit.....	10
1.5	Syndrome und Tumor-Charakteristika der verwendeten Zelllinien.....	11
2	Material und Methoden	17
2.1	Herkunft verwendeter Zelllinien.....	17
2.2	Zellkultur	19
2.3	Kolonietest	20
2.3.1	Versuchsdurchführung.....	20
2.3.2	Auswertung.....	23
2.4	Mikrokern-Assay	23
2.4.1	Versuchsdurchführung.....	23
2.4.2	Auswertung.....	24
2.5	Comet-Assay	26
2.5.1	Versuchsdurchführung.....	26
2.5.2	Auswertung.....	29
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Klonogene Überlebensraten von Zellen nach Röntgenbestrahlung ...	31
3.1.1	Koloniewachstum von Zellen im Kolonietest.....	31
3.1.2	Koloniebildungsfähigkeit unbestrahlter Zellen.....	32
3.1.3	Dosis-Wirkungs-Beziehungen.....	33

3.2	Auswirkung von ionisierender Strahlung auf die Bildung von Mikrokernen	36
3.2.1	Typisches Erscheinungsbild von Zellen im Mikrokern-Assay.....	36
3.2.2	Spontane Mikrokernfrequenz.....	37
3.2.3	Mikrokernfrequenz nach Bestrahlung mit 2 Gy	38
3.2.4	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der absoluten Mikrokernwerte.....	40
3.2.5	Vervielfachung der spontanen Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit von der Strahlendosis.....	43
3.2.6	Untersuchungen zur Mitoserate mit dem Mikrokern-Assay.....	45
3.3	Induktion und Reparatur von bestrahlungsinduzierten DNS-Schäden im Comet-Assay.....	49
3.3.1	Typische Gestalt der Kometen.....	49
3.3.2	Reparaturverlauf der Zellen im Comet-Assay	51
3.3.3	Direkter Vergleich der Parameter TM_{IT} , TM_0 , TM_R und $t_{0.5}$ aller Zelllinien	56
3.4	Korrelationen zwischen Parametern des Kolonietests, des Mikrokern- Assays und des Comet-Assays.....	57
3.4.1	Korrelationen zwischen Kolonietest und Mikrokern-Assay.....	57
3.4.2	Zusammenhänge zwischen Kolonietest und Comet-Assay	62
3.4.3	Korrelationen zwischen Mikrokernen und Comet-Assay.....	64
4	Diskussion	65
4.1	Vorbemerkungen.....	65
4.2	Der Kolonietest als Standard prädiktiver Testverfahren.....	66
4.3	Korrelationen zwischen Kolonietest und Mikrokern-Assay.....	67
4.4	Bemerkungen zur Mitoserate der Zelllinien im Mikrokern-Assay	72
4.5	Korrelationen zwischen Kolonietest und Comet-Assay	73
4.6	Korrelationen zwischen Mikrokern-Assay und Comet-Assay	78
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	80

6	Literaturverzeichnis	83
7	Anhang.....	100
7.1	Medien und Lösungen für die Zellkultur	100
7.2	Chemikalien	100
7.3	Glas- und Plastikmaterialien	101
7.4	Geräte und spezielle Materialien.....	101
7.5	Lösungen und Puffer.....	103
7.5.1	Kolonietest	103
7.5.2	Mikrokern-Assay	103
7.5.3	Comet-Assay	104

Abkürzungsverzeichnis

ALS	Alkali-labile Stellen
AT	Ataxia teleangiectasia
CFE	colony forming efficiency
CFGE	Konstantfeld-Gelelektrophorese
CHOR	Chorionkarzinom
DKZ	doppelkernige Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSB	Doppelstrangbruch
FA	Fanconi-Anämie
FCS	fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in situ Hybridisierung
GLIO	Glioblastom
Gy	Gray
HMA	High Melting Agarose
kg	Kilogramm
l	Liter
LMA	Low Melting Agarose
LQ-Modell	linear-quadratisches Modell
MEL	Melanom
MG	Molekulargewicht
Min	Minute
MK	Mikrokerne
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RTOG	Radiotherapy Oncology Group
SCGE	single cell gel electrophoresis
SF2	surviving fraction at 2 Gray
SSB	single-strand break
Tris	TRIZMA Base

1 Einleitung

1.1 Strahlennebenwirkungen - ein entscheidendes Problem der Strahlentherapie

Unmittelbar nach der Entdeckung der „X-Strahlen“ durch Wilhelm Conrad Röntgen 1895 in Würzburg setzte eine intensive Forschung ein. Selten wurde eine Entdeckung derartig schnell in die medizinische Routine übernommen wie die Röntgenstrahlen. Schon 1896 nutzte Leopold Freund als Erster Röntgenstrahlen in therapeutischer Absicht bei einem Mädchen mit Tierfellnävus. Als Nebenwirkung stellte sich eine schwere Ulzeration der Haut des Mädchens ein. Solche Veränderungen und Schädigungen durch Röntgenstrahlen wurden schon früh registriert, ihre Tragweite in der Anfangszeit aber fast immer unterschätzt [Schott et al., 1993]. Bis heute stellen die Nebenwirkungen ionisierender Strahlen ein entscheidendes Problem der Strahlentherapie dar.

Mit Hilfe der modernen Strahlentherapie ist es möglich, durch eine computer-gestützte 3D-Bestrahlungsplanung und den Einsatz von verschiedensten Bestrahlungstechniken sehr präzise ein Zielvolumen mit einer bestimmten Dosis zu bestrahlen und umliegendes Gewebe zu schonen. Trotzdem wird die am Tumor applizierbare Dosis durch die Toleranz der Normalgewebe limitiert. Patienten reagieren individuell sehr unterschiedlich auf eine Bestrahlung. Etwa 5-10% aller Patienten zeigen bei Strahlendosen, die von anderen Patienten problemlos vertragen werden, starke Nebenwirkungen [Norman et al., 1988]. Bei den heute verwendeten Therapieschemata muss diese empfindliche Subgruppe berücksichtigt und die Dosis entsprechend niedrig gehalten werden. Dies führt zwangsläufig dazu, dass nicht alle Patienten die für sie maximal verträgliche Dosis erhalten, wodurch auch die potentiellen Möglichkeiten der Strahlentherapie nicht voll ausgenutzt werden können. Könnte man die radiosensiblen Patienten vor der Bestrahlung herausfiltern, würde dies für die weniger empfindlichen Patienten zu einer bis zu 20%igen Steigerung der

Tumorkontrollrate, bei gleichbleibendem Level an Nebenwirkungen, führen [West et al., 1991].

Aus solchen Überlegungen entwickelte sich schon früh der Wunsch nach prädiktiven Tests zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit von Normalgeweben und Tumoren vor Therapiebeginn. Optimal wäre ein Verfahren, das mit geringem Zeit- und Materialaufwand zuverlässig eine Aussage über die Strahlenempfindlichkeit von Normalgeweben und Tumoren getesteter Patienten träge. Hierdurch würde eine individuelle Strahlentherapie möglich, die bei tolerierbarem Nebenwirkungslevel für den Patienten einen maximalen Effekt am Tumor erzielen könnte.

Eine grundlegende Voraussetzung für die Entwicklung prädiktiver Tests in der Strahlentherapie ist eine möglichst genaue Kenntnis der Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen. Diese aufzuklären, ist Gegenstand intensiver Forschung der Strahlenbiologie. Einige Mechanismen sind heute schon beschrieben und werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

1.2 Zelluläre Wirkungen ionisierender Strahlung

Am Anfang aller biologischen Strahlenschäden stehen Veränderungen der DNS im Zellkern. Die verschiedenen Arten von DNS-Schäden treten dabei mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Basenschäden (2000 bis 4000/Gy/Zelle) sind die häufigsten Ereignisse, gefolgt von Einzelstrangbrüchen (1000/Gy/Zelle). Seltener treten DNS-DNS- bzw. DNS-Protein-Verknüpfungen (150 bis 200/Gy/Zelle) auf. Noch seltener sind Doppelstrangbrüche (40/Gy/Zelle), das heißt Brüche beider komplementärer DNS-Stränge [Dahm-Daphi et al., 1998]. Basenschäden und Einzelstrangbrüche werden von der Zelle schnell erkannt, das fehlerhafte DNS-Stück herausgeschnitten und die entstandene Lücke durch Polymerasen anhand des komplementären DNS-Strangs wieder ergänzt. Auf diese Weise werden Einzelstrangbrüche zu einem großen Teil korrekt repariert. Ihr biologischer Effekt auf das Zellüberleben ist gering und Mutationen sind selten [Wallace, 1994]. Im Gegensatz dazu existiert für die Reparatur von

Doppelstrangbrüchen keine exakte Vorlage mehr. Bekannte Reparaturmechanismen dieser Schädigungen wie homologe Rekombination, nicht-homologe Rekombination und nicht-homologe Verknüpfung von Strangenden können daher zu genetischen Veränderungen führen. Einige Doppelstrangbrüche sind für Zellen irreparabel [Szostak et al., 1983; Lutze et al., 1993; Philips et al., 1994; Daza et al., 1996].

Zellen, die ionisierender Strahlung ausgesetzt waren, werden durch das Zusammenspiel vieler zellulärer Proteine, wie ATM, p53, p21^{cip1}, RB cyclin E und cdk2, zwischen der G1- und der S-Phase des Zellzyklus blockiert [Maity et al., 1994]. Bei einem nicht geringen Teil geschädigter Fibroblasten und epithelähnlicher Zellen ist diese Blockade dauerhaft [Linke et al., 1997] und verhindert so, dass die geschädigten Zellen die S-Phase durchlaufen. Nach einer Latenzzeit kommt es zur Ausdifferenzierung dieser Zellen und sie „überleben“, ohne weitere Mitosen zu durchlaufen [Rodemann et al., 1994]. Gelingt es geschädigten Zellen trotzdem, wieder in den Zellzyklus einzutreten, so werden sie erneut blockiert, diesmal zwischen der G2- und der Mitosephase. Aus diesem Block werden die Zellen im Normalfall nach einigen Stunden in die Mitose entlassen [Maity et al., 1994]. Die meisten Zellen mit geschädigten Chromosomen sind nicht in der Lage, den Zellzyklus weiter als bis zur Metaphase zu durchlaufen. Die wenigen Zellen, die sie durchlaufen, sterben meist während der nächsten Zellzyklen ab [Dahm-Daphi et al., 1998]. Diese Art des Zelltodes wird als mitotischer Zelltod bezeichnet. Einen dritten Weg, der zur Inaktivierung bestrahlter Zellen führt, stellt der programmierte Zelltod, die Apoptose, dar. Alle hier erwähnten Mechanismen führen letztendlich zum reproduktiven Zelltod [siehe Abbildung 1.1].

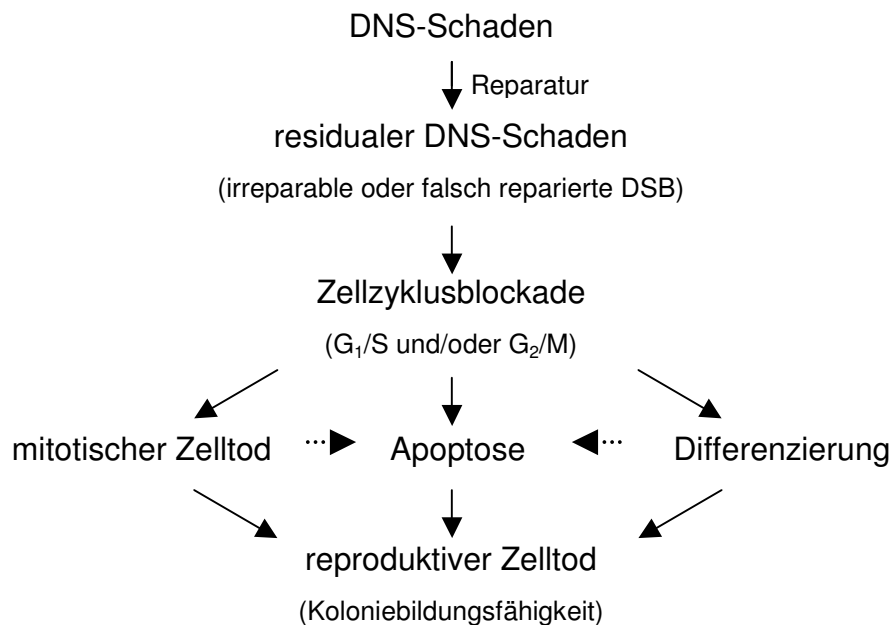


Abbildung 1.1: Zelluläre Ereignisse vom DNS-Schaden bis zum reproduktiven Zelltod [Dahm-Daphi et al., 1998].

1.3 Prädiktive Testverfahren

Heute stehen eine Reihe von Testmethoden zur Verfügung, mit denen versucht wird, die individuelle Strahlensensibilität von Patienten vor einer Bestrahlung zu bestimmen. Diese Testverfahren beruhen auf in vitro Tests mit Zelllinien oder Einzelzellen der Patienten. Meistens werden Lymphozyten oder Fibroblasten verwendet. Die wichtigsten Testmethoden werden im folgenden Abschnitt vorgestellt und ihre Vor- und Nachteile erörtert.

Der Koloniebildungstest ist eine der ältesten Methoden zur Beurteilung von Strahlenempfindlichkeiten in vitro und wurde schon vor über 40 Jahren entwickelt [Puck et al., 1956]. Die zu testenden Zellen werden bestrahlt und anschließend in einem flachen Gefäß mehrere Wochen lang inkubiert. Zellen, die nach der Bestrahlung noch teilungsfähig sind, bilden auf dem Boden der Gefäße Kolonien, die sich nach Anfärbung mit einem geeigneten Farbstoff aus-

zählen lassen. Als allgemein anerkannter Parameter zur Beurteilung der Empfindlichkeit von Zelllinien gilt die „surviving fraction at 2 Gy (SF2)“. Sie sagt aus, welcher Anteil der Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy noch in der Lage ist, Kolonien zu bilden. Der Kolonietest stellt ein globales Testsystem für die durch Bestrahlung entstandenen Schäden dar. Letztendlich führen alle Ereignisse, die einen reproduktiven Zelltod bewirken, zu einer reduzierten Koloniezahl (Abbildung 1.1). Welches Ereignis im Einzelfall aber für die Reduktion der Koloniebildung verantwortlich war, kann im Nachhinein nicht festgestellt werden.

Ein großer Nachteil des Kolonietests sind die langen Inkubationszeiten, die bis zu mehreren Wochen betragen können. Dies macht ihn ungeeignet für eine klinische Anwendung, bei der schnell Ergebnisse zur Verfügung stehen müssen. Hinzu kommt, dass sich einige empfindliche Zelllinien gar nicht *in vitro* anzüchten lassen. Trotzdem gilt der Kolonietest immer noch als Goldstandard für die Testung von Radiosensibilität [Pomp et al., 1996].

Eine noch umstrittene Frage ist, inwieweit der Kolonietest die Reaktion von Patienten auf eine Bestrahlung vorhersagen kann. Es wurde in vielen Studien versucht, Zusammenhänge zwischen der zellulären Strahlensensibilität von Fibroblasten im Kolonietest und frühen oder späten Hautreaktionen von Patienten nach einer Radiotherapie zu finden. Die bisherigen Ergebnisse sind widersprüchlich. So wurde in einigen Studien eine Korrelation zwischen SF2 und der späten Hautreaktion von Patienten nach der Bestrahlung gefunden [Burnet et al., 1994; Alsbeih et al., 2000], andere Studien konnten diese Korrelation jedoch nicht nachweisen [Peacock et al., 2000; Oppitz et al., 2001]. Ähnlich sieht es mit der Korrelation von frühen Hautreaktionen der Patienten mit dem Parameter SF2 aus. Oppitz et al. (2001) konnten eine Korrelation nachweisen, Rudat et al. (1997) hingegen nicht. Insgesamt ist daher noch unklar, ob es mit dem Kolonietest möglich ist, zwischen klinisch empfindlichen und normal reagierenden Patienten zu unterscheiden.

Eine weitere Testmethode ist der Mikrokern-Assay. Mikrokern sind chromatinhaltige Partikel, welche völlig getrennt vom Zellkern im Zytoplasma von Zellen

liegen [Schiffmann et al., 1991]. Sie können durch viele verschiedene exogene Noxen, zum Beispiel radioaktive Strahlung, induziert werden. Schiffmann et al. (1991) konnten mittels immunhistochemischer und transmissions-elektronen-mikroskopischer Untersuchungen die Ultrastruktur der Mikrokerne aufklären. Mikrokerne sind demnach aufgebaut wie normale Interphasekerne. Sie enthalten ganze Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke und werden wie der Zellkern von einer Kernmembran mit Nukleoporen umgeben. Die Größe der Mikrokerne ist sowohl vom Inhalt als auch von der Art des induzierenden Agens abhängig [Högstedt et al., 1985]. Aus dem oben beschriebenen geht hervor, dass die Bildung von Mikrokerneln zu einem Verlust von genetischem Material im Zellkern und zu einer Aneuploidie der Zelle führt.

Heute hat sich eine Methode nach Fenech et al. (1985) durchgesetzt, die ein leichtes Erkennen von Mikrokerneln ermöglicht. Hierbei werden Zellen einer zu testenden Noxe ausgesetzt, abgewartet bis sich die Zellen einmal geteilt haben und dann, nach entsprechender Anfärbung, die induzierten Mikrokerne in den Zellen ausgewertet. Um unterscheiden zu können, ob eine Zelle schon eine Mitose durchlaufen hat oder nicht, wird kurz vor der Einwirkung der Noxe Cytochalasin B zu den Zellen gegeben. Cytochalasin B ist eine Substanz, welche die Zellteilung hemmt, nicht aber die Kernteilung. Durchlaufen die Zellen nun eine Mitose, so entstehen doppelkernige Zellen, in deren Zytoplasma die induzierten Mikrokerne gut sichtbar sind.

Der Mikrokerneln-Assay ist ein leicht durchführbarer Test, bei dem nur einige tausend Zellen benötigt werden. Zudem können die Ergebnisse in wenigen Tagen zur Verfügung stehen. Unklar ist aber auch beim Mikrokerneln-Assay noch, ob der Anteil an Zellen mit Mikrokerneln nach Bestrahlung mit der klinischen Sensibilität von Patienten korreliert. Die bisherigen Ergebnisse sind uneinheitlich. Nachtrab et al. (1998) wiesen eine höhere Mikrokernelnfrequenz bei klinisch strahlensensiblen Patienten nach, eingeschlossen Patienten mit Ataxia teleangiectasia. Im Gegensatz dazu fanden Slonina et al. (2000) keine signifikante Korrelation zwischen der Radiosensitivität normaler Fibroblasten im Mikrokerneln-Assay und frühen oder späten Hautreaktionen von Patienten mit verschiedenen Neoplasien. Auch Rached et al. (1998) konnten keine Beziehung

zwischen einer hohen Anzahl an Mikrokernen und dem Auftreten von akuten Hautreaktionen nachweisen. Sie fanden dafür aber insgesamt eine höhere Mikrokernfrequenz bei Krebspatienten als bei gesunden Zellspendern. Auch beim Mikrokern-Assay ist also noch nicht endgültig geklärt, ob er die Strahlensensibilität von Patienten vorhersagen kann.

Ein weiteres, immer häufiger verwendetes Verfahren ist der Comet-Assay. Mit dem Comet-Assay ist es erstmals möglich, direkt quantitative Schäden der DNS an einzelnen Zellen zu untersuchen. Der ursprüngliche Ansatz stammt von Rydberg und Johanson (1978). Sie erkannten, dass der Zellkern bestrahlter und mit alkalischen Lösungen behandelter Zellen dosisabhängig zunehmend diffuser erscheint. Um ihre Beobachtung quantifizieren zu können, betteten sie unter milden alkalischen Bedingungen Zellen in Agarose auf Objektträgern ein. Das alkalische Milieu bedingt eine partielle Aufwindung der Tertiärstruktur der DNS. Anschließend neutralisierten sie die Zellen und färbten sie mit Acridine Orange an. Doppelsträngige DNS erschien nun rot, DNS-Einzelstränge wurden grün sichtbar. Durch Bestimmung des Verhältnisses von grüner zu roter Fluoreszenz konnte das Maß der DNS-Schädigung bestimmt werden. Da diese Technik sehr fehleranfällig ist, wird sie heute kaum noch genutzt. 1984 beschrieben Ostling und Johanson eine Elektrophorese-Methode, die eine höhere Sensitivität für die Messung von DNS-Schäden ermöglichte. Zunächst wählten sie Zellkulturen aus und bestrahlten diese. Anschließend betteten sie die Zellen in Agarose auf Objektträgern ein und ließen die Agarose erhärten. Nun zerstörten sie die Struktur der Zellen mit Hilfe eines Lysepuffers und setzten sie einem elektrischen Feld aus. Aufgrund ihrer negativen Ladung wanderte die DNS in Richtung der Anode. Nach Beendigung der Elektrophorese färbten sie die Objektträger mit dem an die DNS bindenden Fluoreszenzfarbstoff Acridine Orange. Nun wurde die Migration von DNS-Bestandteilen sichtbar und erschien als eine Art Schweif hinter dem Zellkern. Deshalb ist das Verfahren heute als „Comet-Assay“ oder auch „single cell gel electrophoresis (SCGE)“ bekannt. Während der zunehmenden Verbreitung des Comet-Assays wurde das ursprüngliche Protokoll mehrmals variiert und optimiert. Eine wesentliche Ände-

rung des Verfahrens nahmen Singh et al. (1988) vor. Sie führten sowohl die Lyse der Zellen als auch die Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen durch. Dadurch wurde es möglich, nicht nur Doppelstrangbrüche (DSB) der DNS wie beim neutralen Comet-Assay zu beurteilen, sondern auch Einzelstrangbrüche (SSBs, single-strand breaks) und Alkali-labile Stellen (ALS) zu detektieren.

Es gibt verschiedene Theorien darüber, was letztendlich dem „Kometen“ in der Einzelzellgelelektrophorese entspricht. Durch den Lysepuffer werden Zellen permeabilisiert und die nukleären Proteine extrahiert. Die DNS bleibt in einer kugelförmigen Höhle der Agarose zurück. Einzelstrangbrüche bewirken eine Relaxation der Superspiralisierung der DNS und eine Bildung von DNS-Schleifen. Es resultiert ein Zellkern, der Chromosomen enthält, die aus Abschnitten mit normaler superspiralisierter DNS und nicht superspiralisierten Teilen mit teilweise offenen Schlaufen besteht. Das Makromolekül selbst kann nicht aus dem Hohlraum in die Agarose wandern. Die Schlaufen jedoch können, noch mit der nukleären Matrix verbunden, sich in Richtung der Anode eines elektrischen Feldes ausstülpen [McKelvey-Martin et al., 1993]. Auf der anderen Seite bewirkt eine Inkubation der Zellen in alkalischem Milieu nach der Lyse eine Aufhebung der Basenpaarung und somit eine Denaturierung der DNS. Möglicherweise werden dadurch Fragmente verschiedener Struktur vom Kern abgetrennt und können frei ohne Verbindung zur nukleären Matrix in Richtung der Anode wandern. Zu bedenken ist hierbei, dass sehr kleine Fragmente, die durch hohe Bestrahlungsdosen entstehen, während der Elektrophorese verloren gehen könnten [Bauch et al., 1999]. Insgesamt ist also anzunehmen, dass der Kometen-Schweif einerseits aus mit der nukleären Matrix verbundenen DNS-Schleifen und andererseits aus freien DNS-Bruchstücken verschiedener Struktur besteht.

Neben dem Ausmaß der DNS-Schädigung sind auch methodische Faktoren für die Ausbildung der Kometen-Struktur verantwortlich. Agarosekonzentration, pH-Werte der Pufferlösungen, Dauer des Entwindens vor der Elektrophorese, Elektrophoresezeit und die Stärke des elektrischen Feldes haben hier einen Einfluss auf den Kometen [Bauch et al., 1999].

Der Comet-Assay ist ein einfach durchführbares Testverfahren, durch das innerhalb eines Tages mit wenigen Zellen Informationen über die Empfindlichkeit von Zellen auf eine Bestrahlung erhalten werden können. Zunehmend wird auch hier nach Zusammenhängen zwischen der klinischen Strahlensensibilität von Patienten und Parametern des Comet-Assays mit bisher erfolgversprechenden Ergebnissen gesucht. So gelang es in einer Studie an Lymphozyten zu zeigen, dass heterozygote AT-Erbträger einen signifikant höheren initialen DNS-Schaden und eine signifikant langsamere DNS-Reparaturhalbwertszeit als gesunde Spender haben [Djuzenova et al., 1999]. Oppitz et al. (1999) fanden eine verzögerte Reparatur der DNS-Schäden von Fibroblasten bei an Neoplasien erkrankten Patienten, die nach der Bestrahlung besonders schwere akute oder späte Nebenwirkungen entwickelten. Der initiale und der nach der Reparatur verbleibende DNS-Schaden waren aber nicht erhöht. Eine weitere Studie ermittelte bei einem Teil von überempfindlichen Mammakarzinom-Patientinnen einen erhöhten DNS-Residualschaden der Lymphozyten [Alapetite et al., 1999]. Außerdem wurde in der Studie eine beeinträchtigte Reparatur der DNS-Schäden bei vier Mammakarzinom-Patientinnen und einem Patienten mit Morbus Hodgkin nachgewiesen, die sehr schwere Nebenwirkungen nach Bestrahlung (RTOG Grad 4) zeigten. Andererseits konnten Twardella et al. (2003) keine signifikante Korrelation zwischen dem induzierten DNS-Schaden, sowie der Reparaturkapazität bei 84 Mammakarzinom-Patientinnen und dem Risiko von akuten Hautschäden nach Bestrahlung finden. Popanda et al. (2003) stellten bei den von ihnen getesteten Patienten fest, dass mit dem Comet-Assay zwar Individuen mit DNA-Reparaturdefekten erkannt werden können, diese Reparaturdefekte aber nur wenig mit dem Auftreten von akuten Strahlennebenwirkungen der Haut zusammenhängen. Inwieweit der Comet-Assay für eine klinische Testung von Patienten geeignet ist, muss also noch weiter abgeklärt werden.

Es gibt weitere Testverfahren, mit denen versucht wird, die Strahlensensibilität von Patienten zu bestimmen. Zwei von ihnen, die Pulsfeld- (PFGE) und die Konstantfeld-Gelelektrophorese (CFGE), basieren auf einem ähnlichen Prinzip

wie der Comet-Assay. Nachteile dieser Testverfahren sind aber, dass sie nur Doppelstrangbrüche messen und wegen ihrer geringen Empfindlichkeit hohe Bestrahlungsdosen (20-150 Gy) notwendig sind, die weit entfernt von klinisch relevanten Dosen liegen. Ein weiteres wichtiges Testverfahren zur Messung von Strahlenschäden in Zellen ist die in situ Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden (FISH). Durch Anfärbung einzelner Chromosome oder 24-Farben-FISH können typische Translokationen oder DNS-Brüche dargestellt werden. Auch einige Jahre nach einer Strahlenexposition ist mittels FISH ein Nachweis von stabilen Chromosomenaberrationen noch möglich [Schmid et al., 1992].

1.4 Fragestellung der Arbeit

Aus den vorhergegangenen Ausführungen wird deutlich, dass es inzwischen einige Testverfahren gibt, die Anlass zur Hoffnung geben, dass die klinische Strahlenempfindlichkeit von Patienten in Zukunft durch Labortests vor einer Bestrahlung bestimmt werden kann. Bei den drei gebräuchlichsten Methoden, dem Kolonietest, dem Mikrokern-Assay und dem Comet-Assay, wurde bisher mit widersprüchlichen Ergebnissen versucht, Korrelationen zwischen der klinischen Strahlenempfindlichkeit von Patienten und Parametern der Testverfahren zu finden. Warum einige Studien einen Zusammenhang finden, andere aber nicht, ist letztlich noch ungeklärt. Weiterhin ist noch nicht bekannt, welcher Parameter eines Testverfahrens am geeignetsten ist, die klinische Strahlenempfindlichkeit von Patienten widerzuspiegeln. Außerdem ist es bisher weitgehend unklar, ob die drei Testverfahren analoge Ergebnisse liefern, oder ob sie verschiedene Aspekte der Strahlensensibilität von Zellen messen. Insgesamt zeigt sich auf dem Gebiet prädiktiver Testverfahren noch ein hoher Forschungsbedarf.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung der oben genannten Fragen leisten. Anders als in den meisten bisher veröffentlichten Studien wurde eine völlig heterogene Gruppe an Zelllinien ausgewählt. Darunter waren Fibroblasten von klinisch normal auf eine Bestrahlung reagierenden Patienten und Fibroblasten

von Patienten mit Ataxia teleangiectasia sowie Fanconi-Anämie. Des Weiteren wurde eine Zelllinie eines Patienten mit einem bisher nicht aufgeklärten, AT-ähnlichen Syndrom in die Studie einbezogen. Außerdem wurden drei unterschiedliche Tumorzelllinien, ein Glioblastoma multiforme, ein malignes Melanom und ein Chorionkarzinom, ausgewählt. Mit allen Zelllinien wurde der Kolonietest, der Mikrokern-Assay und der Comet-Assay durchgeführt. So sollten folgende Fragen geklärt werden:

- Wie reagieren diese völlig verschiedenen Zelllinien auf eine Bestrahlung in vitro?
- Welche Eigenschaften der Zelllinien könnten kausal für das Verhalten der Zellen in den einzelnen Testverfahren von Bedeutung sein?
- Bestehen Korrelationen zwischen den drei Testverfahren und wenn ja, zwischen welchen Parametern?
- Wie verhalten sich die gefundenen Ergebnisse zu denen anderer aktueller Studien?
- Welche Konsequenzen ergeben sich daraus für die weitere Forschung auf dem Gebiet prädiktiver Testverfahren?

1.5 Syndrome und Tumor-Charakteristika der verwendeten Zelllinien

Im Folgenden werden die Syndrome und Charakteristika der acht verwendeten Zelllinien kurz vorgestellt.

Zwei Zelllinien stammten von Fibroblasten normal strahlenempfindlicher Patientinnen, die aufgrund eines Mammakarzinoms bestrahlt wurden. Sie dienten als Referenzzellen, mit denen die anderen Zelllinien verglichen werden sollten.

Eine weitere Zelllinie wurde aus Zellen eines Patienten etabliert, der an Ataxia teleangiectasia (AT), auch Louis-Barr-Syndrom genannt, erkrankt ist. Kinder mit diesem autosomal-rezessiv vererbaren Syndrom kommen zunächst klinisch unauffällig auf die Welt. Etwa im zweiten bis fünften Lebensjahr bildet sich eine progressive zerebellare Ataxie aus. Weitere neurologische Symptome sind

okulomotorische Apraxie, Dystonie, progressive spinale Muskelatrophie, Choreoathetose und eine langsame, schlecht artikulierte Sprache. Nach Beginn der Ataxie werden zunehmend Teleangiektasien beobachtet, die meist zuerst an den Konjunktiven auffallen [Regueiro et al., 2000]. Zusätzlich besteht in unterschiedlich schwerer Ausprägung eine Immunschwäche. Sie äußert sich meist in sinupulmonalen Infektionen und führt zu einer chronischen Lungenerkrankung mit Bronchiektasien und pulmonaler Fibrose. Etwa die Hälfte aller Patienten stirbt an respiratorischer Insuffizienz durch eine hinzutretende Pneumonie [Gatti et al., 2001]. AT-Patienten haben eine ausgeprägte Prädisposition für Krebserkrankungen. Besonders häufig sind Lymphome und Leukämien [Morrell et al., 1986]. Alle Krebserkrankungen zusammen stellen die zweithäufigste Todesursache dieser Patienten dar.

Ein wichtiges Merkmal von AT-Zellen in vitro ist ihre stark erhöhte Strahlensensibilität im Kolonietest [Taylor et al., 1975]. Des Weiteren ist für AT-Zellen eine erhöhte Mikrokern-Induktion [Scott et al., 1996; Nachtrab et al., 1998], eine erhöhte Frequenz an Chromosomenaberrationen [West et al., 1995; Mitchell et al., 1997; Tchirkov et al., 1997] und defekte Zellzyklus-Antworten auf Bestrahlung [Seyschab et al., 1992; Naiem et al., 1994] beschrieben worden.

Heute ist auch das genetische Korrelat der AT bekannt. Es besteht in einer großen Anzahl verschiedener Mutationen [Concannon et al., 1997] im ATM (AT-mutated)-Gen [Gatti et al., 1988; Savitsky et al., 1995]. Das ATM-Protein gehört zu einer Gruppe von DNS-Phosphokinasen und spielt eine zentrale Rolle bei der Zellzykluskontrolle und der DNS-Reparatur. Dies wird durch die Phosphorylierung einer immer größer werdenden Anzahl bekannter Substrate, wie zum Beispiel p53, c-Abl, Brca1 und Rad51 erreicht [Gatti et al., 2001]. Patienten mit Ataxia teleangiektasia fehlt das ATM-Protein, oder es ist nicht funktionsfähig.

Eine weitere Zelllinie stammte von einer Patientin, bei der im Alter von 3-4 Jahren der Verdacht auf Ataxia teleangiektasia bestand. Sie litt an einer Ataxie und einem milden Immundefekt. Außerdem zeigten ihre Zellen eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit. Später entwickelte sich die Patientin körperlich

erstaunlich gut, so dass der Verdacht auf AT fallengelassen wurde. Eine exakte Diagnose konnte bis heute nicht gestellt werden. Die klinische Strahlensensibilität der Patientin ist nicht bekannt.

Bei einer weiteren in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie handelte es sich um Fibroblasten eines Patienten mit Fanconi-Anämie (FA). Die Fanconi-Anämie ist eine sehr seltene autosomal-rezessive aplastische Anämieform. Klinisch manifestiert sie sich mit einer Panzytopenie, einer milden geistigen Retardierung und Minderwuchs. Hinzu kommen Skelettanomalien in Form einer Hypo- bzw. Aplasie von Daumen und Radius. Auch Nierenfehlbildungen und fleckförmige braune Pigmentationen der Haut sind typische Merkmale [Sandberg, 1980; Strathdee et al., 1992].

Zellen von Fanconi-Anämie-Patienten neigen zu einer erhöhten Chromosomen-Brüchigkeit [Schröder et al., 1973]. Zusätzlich zeigen sie eine hohe Empfindlichkeit gegenüber DNS-Crosslinkern wie Mitomycin C [Sasaki et al., 1973] oder Diepoxybutan [Auerbach et al., 1976]. Auch eine erhöhte Empfänglichkeit für Sauerstoff-induzierte Schäden wurde beschrieben [Joenje et al., 1981]. Ob Fanconi-Anämie-Zellen auch eine erhöhte Strahlensensibilität aufweisen, ist noch umstritten. Es gibt eine Reihe Studien, die dies behaupten [Burnet et al., 1994; Carreau et al., 1999; Djuzenova et al., 2001]. Ebenso gibt es aber auch viele Studien, in denen bei FA-Zellen eine normale Strahlensensibilität gefunden wurde [Weichselbaum et al., 1980; Duckworth-Rysiecki et al., 1985]. Duckworth-Rysiecki et al. (1985) haben außerdem Unterschiede bei der Reaktion verschiedener Zelltypen von Fanconi-Anämie-Patienten beschrieben. Demnach erscheinen Lymphozyten strahlensensibler als Fibroblasten.

Klinisch zeigen viele FA-Patienten starke Reaktionen auf Bestrahlungen, die sie zur Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen oder zur Vorbereitung auf eine Konchenmarktransplantation erhalten haben. Zum Beispiel sind schwere Hauterytheme mit feuchter Schuppung [Wilkinson et al., 1984], Ulzerationen, Mukositis [Lustig et al., 1995; Marcou et al., 2001], Ödeme des Larynx, Pneumonitis [Kozarek et al., 1981] und Blutungen [Kozehvnikov et al., 1986] beschrieben worden. Marcou et al. (2001) beschrieben in einem Fall eine

Patientin mit Fanconi-Anämie, die mit starken Reaktionen auf eine Bestrahlung reagierte, deren Zellen aber in vitro eine normale Strahlenempfindlichkeit im Kolonietest zeigten. Insgesamt ist die Strahlensensibilität der Fibroblasten von Fanconi-Anämie-Patienten noch nicht endgültig geklärt.

Eine weitere Zelllinie wurde aus Zellen eines Chorionkarzinoms etabliert. Chorionkarzinome sind hochaktive Proliferationsformen von Trophoblastgewebe mit einer über das physiologische Maß hinausgehenden Infiltrationstendenz und Neigung zur Metastasierung. Die normalen regulatorischen Mechanismen, die ein zu weites Einwachsen des Trophoblasten in das Endometrium und das Myometrium verhindern, sind den Tumorzellen verloren gegangen. Chorionkarzinome können prinzipiell nach jeder „Art einer Schwangerschaft“ auftreten. Am häufigsten (29-83% in verschiedensten Studien der WHO, 1983) ist jedoch eine komplette Blasenmole in der Vorgeschichte zu finden. Klinisch fallen die Karzinome durch die Verursachung vaginaler Blutungen, durch abdominelle Schmerzen oder aufgrund der Tumormasse im Becken auf. In über einem Drittel der Fälle werden sie jedoch erst durch die Symptome einer Metastasierung in Lunge, Gehirn oder Leber entdeckt [Tidy et al., 1995].

Chorionkarzinome haben die verschiedensten Karyotypen mit diversen Polyploidien und unterschiedlichen Chromosomenaberrationen, von denen aber keine spezifisch für diese Neoplasie ist [Arima et al., 1994].

Eine weitere Zelllinie stammte aus einem malignen Melanom, einem Hauttumor hoher Malignität. Melanome metastasieren früh und führen zu einer globalen Letalität (alle Stadien) von 20-30%. Ihre Inzidenz steigt weltweit stark an. Melanome entwickeln sich bevorzugt an sonnenexponierten Hautarealen. Besonders oft betroffen sind Menschen mit heller Haut und roten oder blonden Haaren [Beral et al., 1983].

Die Standardtherapie der Melanome besteht aus einer chirurgischen Exzision des Tumors. Trotzdem sind Melanome nicht unbedingt strahlenresistent. Dies zeigte eine Studie der RTOG, in der Melanome mit einer Größe unter 5 cm alleine mit Strahlentherapie behandelt wurden [Sause et al., 1991]. Dies führte

in 31% zu einer kompletten Remission. Insgesamt scheint die Strahlensensibilität von Melanomzellen nicht einheitlich zu sein. In vitro zeigen Melanomzellen verschiedener Patienten signifikant unterschiedliche Strahlensensibilitäten. Sogar bei Melanomzellen verschiedener Läsionen einzelner Patienten wurden Unterschiede in der Strahlensensibilität beobachtet [Swift et al., 1992].

Die dritte verwendete Tumorzelllinie besteht aus Zellen eines Glioblastoms. Glioblastome sind hoch maligne, wenig differenzierte Astrozytome (WHO Grad IV) und machen etwa 15% aller Hirntumoren aus. Sie sind damit die häufigsten primären Hirntumoren überhaupt. Die Mehrzahl der erkrankten Personen ist zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 60 und 70 Jahre alt [Pinsker et al., 2001]. Typischerweise entstehen Glioblastome in einer Hemisphäre, breiten sich über das Corpus callosum auf die andere Seite aus und imponieren dann makroskopisch als klassische Schmetterlingsgliome. Aufgrund der massiven Invasion des Tumors in umliegendes Hirngewebe und der damit verbundenen starken Neigung zur Ödembildung kommt es schon früh zur Entwicklung von Hirndruck und Massenverschiebungen.

Es werden zwei verschiedene molekulare Wege der Tumorentstehung beschrieben. Zum einen gibt es eine Progression vom Astrozytom Grad II über das anaplastische Astrozytom Grad III bis zum Glioblastom. Besonders bei älteren Patienten werden aber auch Glioblastomentstehungen de novo beschrieben. In beiden Fällen sind Verluste oder Mutationen von Tumorsuppressorgenen (z.B. p53), Veränderungen an Kontrollgenen des Zellzyklus (z.B. CDKN2-Lokus für den Zellzyklusregulator p16) und der Apoptose (Kooperation von p16 mit p53) an der malignen Entartung der Zellen beteiligt [Pinsker et al., 2001].

Klinisch gehört das Glioblastoma multiforme zu den strahlenresistentesten Tumoren überhaupt [Taghian et al., 1992]. Dies führt dazu, dass selbst bei Kombination der Strahlentherapie mit einer chirurgischen Resektion des Tumors oder Chemotherapie nur etwa 30-40% der Patienten ein Jahr nach Diagnosestellung noch lebt. In vitro wurden bei verschiedenen Glioblastom-Zelllinien große Schwankungen der Strahlensensibilität festgestellt. Diese

Laborergebnisse korrelieren aber nicht mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung bei den einzelnen Patienten [Taghian et al., 1995].

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft verwendeter Zelllinien

In der vorliegenden Studie wurden acht humane Zelllinien unterschiedlichster Herkunft mit verschiedenster klinischer Strahlensensibilität untersucht.

Zwei Zelllinien (117HF, 118HF) wurden an der Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg etabliert und freundlicherweise von Dr. med. U. Oppitz zur Verfügung gestellt. Im Rahmen einer durch die Ethikkommission genehmigten Studie wurden sie aus Hautbiopsien von Patienten gezüchtet, die sich bereit erklärt hatten, an der Studie mitzuwirken.

Die Zelllinien Fis, HRA und Sv wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. D. Schindler vom Institut für Humangenetik der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

Die drei verwendeten Tumorzelllinien JAR, COLO-800 und SNB-19 sind kommerziell erhältlich und wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Abteilung menschliche und tierische Zellkulturen, in Braunschweig erworben.

Bei den Zelllinien **117HF** und **118HF** handelt es sich um Fibroblasten der Haut von Frauen, die aufgrund eines Mammakarzinoms an der Klinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg behandelt wurden. Beide Patientinnen waren zuvor noch nie bestrahlt worden und entwickelten während der Strahlentherapie mit 60 Gy ein Erythem mit trockener Schuppung (Grad 1 nach RTOG-Richtlinien). Veränderungen an anderen Organen traten nicht auf. Die Patientinnen sind damit als klinisch normal strahlensensibel einzustufen.

Die Zelllinie **Fis** stammt von einer Patientin, die an einem Ataxia teleangiektasia-ähnlichen Syndrom litt. Bei den getesteten Zellen handelt es sich um Fibroblasten einer Hautbiopsie der Patientin.

Die Zelllinie **HRA** besteht aus Fibroblasten einer Hautbiopsie eines Patienten, der an einer Fanconi-Anämie Typ C erkrankt ist. Fanconi-Anämie-Patienten sind oft klinisch strahlensensibel. Jedoch ist die individuelle Strahlensensibilität dieses speziellen Patienten unbekannt.

Die Patientin, aus deren Hautbiopsie die Zelllinie **Sv** etabliert wurde, leidet an dem Syndrom Ataxia teleangiectasia.

Aus einem trophoblastischen Tumor der Plazenta einer 24 Jahre alten Frau stammt die Zelllinie **JAR**. Es handelt sich um Zellen eines Chorionkarzinoms. Der Karyotyp der Zellen ist nahezu triploid mit einem Anteil polyploider Zellen von 27% ($60 - 70 < 3n > XXY$).

Die Zelllinie **COLO-800** stammt aus einem subkutanen Knoten eines 14 Jahre alten Jungen mit Melanom. Der Karyotyp der Zellen ist hypotriploid mit einigen hypertriploiden und 8% polyploiden Zellklonen ($64 (50 - 69) < 3n > X$).

Aus einer chirurgischen Resektion eines parietooccipitalen Glioblastoms eines 47 Jahre alten Mannes wurde die Zelllinie **SNB-19** etabliert. Die Zellen erwiesen sich als hypotriploid mit einem 15%igen Anteil an polyploiden Zellen ($63 (58-63) XXY$).

Um die Übersicht zu erleichtern, sind die Zelllinien in den folgenden Kapiteln mit Abkürzungen entsprechend dem zugrunde liegenden Syndrom bzw. des Tumors belegt worden. Die Abkürzungen sind der folgenden Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1: Zelllinien, verwendete Abkürzung, Zellart und Charakterisierung

Zelllinie	Abkürzung	Zellart	Bemerkung
117HF	117HF	dermale Fibroblasten	klinisch normal strahlensensibel
118HF	118HF	dermale Fibroblasten	klinisch normal strahlensensibel
Fis	HF _s	dermale Fibroblasten	Patientin mit AT- ähnlichen Symptomen
HRA	FA	dermale Fibroblasten	Fanconi-Anämie Typ C
Sv	AT	dermale Fibroblasten	Ataxia teleangiectasia
JAR	CHOR	Trophoblast	Chorionkarzinom
COLO-800	MEL	Melanozyten	Melanom
SNB-19	GLIO	Astrozyten	Glioblastom

2.2 Zellkultur

Die Zelllinien 117HF, 118HF, HF_s, FA und AT wurden in einem Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 9% in DMEM-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1% 200 mM L-Glutamin und 1% Penicillin (10000IE/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) inkubiert. Für die Zelllinien MEL und CHOR wurde ein Brutschrank mit einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ verwendet. Sie wurden in RPMI-1640-Medium mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin gezüchtet. Als die Zellen begannen zu konfluieren, wurden sie in mehrere Kulturflaschen (75 cm² Bodenfläche) umgesetzt, so dass sie sich stets in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Dazu wurde unter sterilen Bedingungen das alte Medium abgesaugt, 5 ml Phosphate Buffered

Saline (PBS) zum Spülen auf die Zellen gegeben und dieses anschließend wieder abgesaugt. Um die Zellen vom Boden abzulösen, wurde nun 0,5-1 ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Kulturflasche gegeben, die Zellen wurden für ca. 3-5 Minuten in die entsprechenden Brutschränke gestellt und dann der Ablösevorgang unter dem Mikroskop kontrolliert. Jetzt konnten die abgelösten Zellen in 5 ml vorgewärmtes DMEM- bzw. RPMI-Medium aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt werden. Die Zellen wurden dann für 5 Minuten mit 200 x *g* zentrifugiert. Um die Trypsin/EDTA-Lösung zu entfernen, wurde der Überstand über dem entstandenen Zellpellet abgesaugt und die Zellen wurden erneut in einige Milliliter des entsprechenden Mediums aufgenommen. Die so entstandene Zellsuspension wurde in die vorbereiteten Kulturflaschen mit 10 ml vorgewärmtem Medium gegeben und die jetzt fertig umgesetzten Zellen in die Brutschränke zurückgestellt.

Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen niedriger Passagen (5-10) verwendet.

2.3 Kolonietest

2.3.1 Versuchsdurchführung

Zunächst wurde für den Kolonietest in Vorversuchen ein Pipettierschema für die Zellen erstellt, welches das Wachstumsverhalten der einzelnen Zelllinien berücksichtigte und am Ende der Wachstumsphase zu einer auswertbaren Koloniezahl führen sollte (Tabelle 2.1). Da die hohe Strahlenempfindlichkeit von AT-Zellen im Kolonietest bekannt war, wurde für diese Zelllinie die Bestrahlungsdosis reduziert und ein angepasstes Schema verwendet (Tabelle 2.2).

Der Kolonietest wurde mit jeder Zelllinie dreimal durchgeführt. Er begann mit der Vorbereitung einer „Feeder layer“, welche ein besseres Anwachsen der eigentlichen Testzellen gewährleisten sollte. Dazu wurde eine Kulturflasche der entsprechenden Zelllinie mit 20 Gy an einem Cobalt-Telegamma-Gerät

Tabelle 2.1: Pipettierschema für die Zell-Linien 117HF, 118HF, HFs, FA, CHOR , GLIO und MEL

Dosis (Gy)	Feeder layer (Anzahl)	Testzellen (Anzahl)
0	25000	500
1	25000	1000
2	25000	1000
3	20000	5000
5	15000	10000
7	10000	15000
8	5000	20000

Tabelle 2.2: Pipettierschema für die Zelllinie AT

Dosis (Gy)	Feeder layer (Anzahl)	Testzellen (Anzahl)
0	25000	500
0,5	25000	500
1,0	25000	1000
1,5	25000	1000
2,0	20000	5000
2,5	15000	10000
3,0	5000	20000

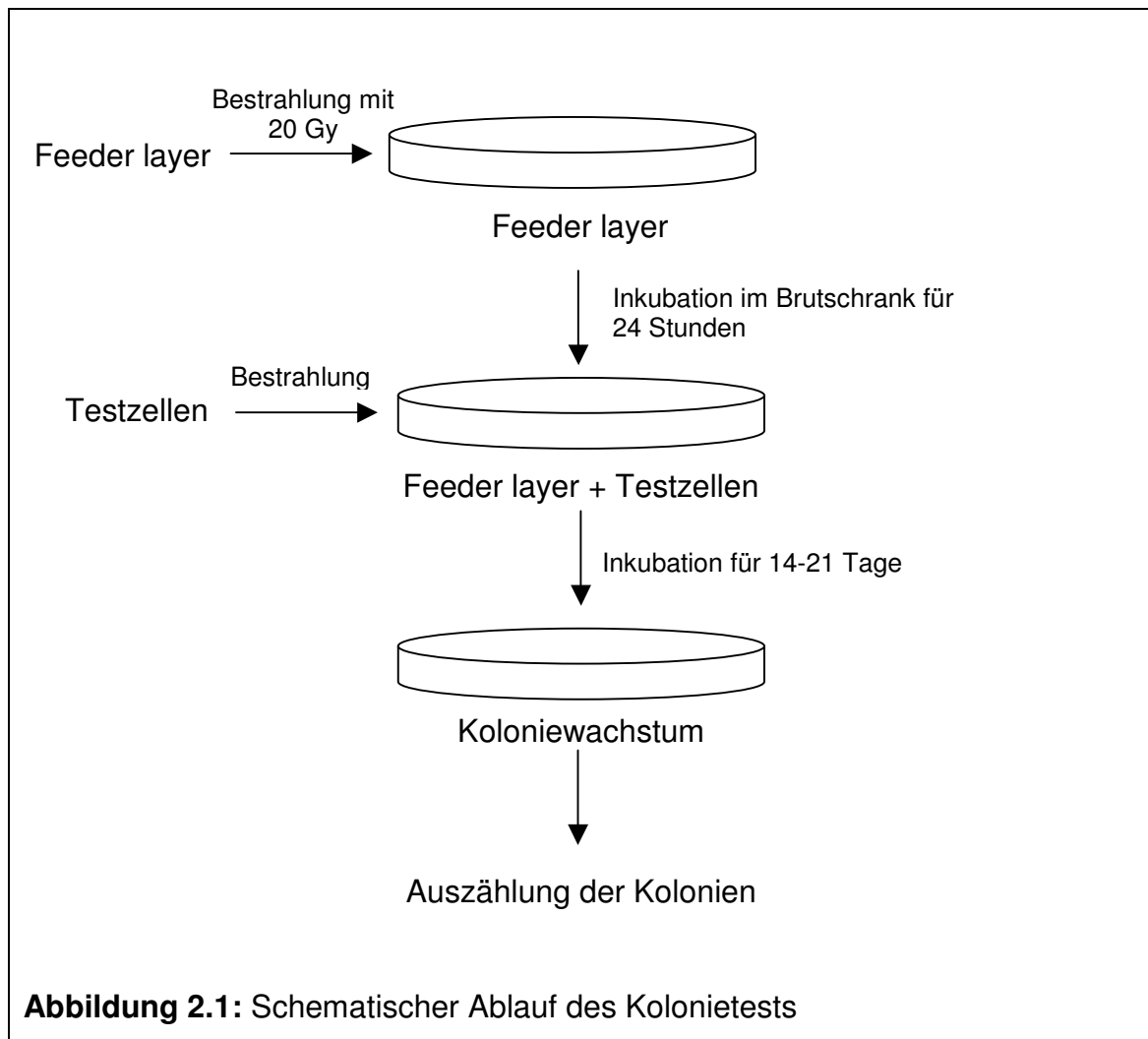
(⁶⁰Co-Theratron 780C, Philips, Crowley, Großbritannien) tot bestrahlt, so dass diese Zellen sich selbst nicht mehr teilen konnten. Nach einer Stunde im Brutschrank wurde die Feeder layer vom Boden der Kulturflasche abgelöst und zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in etwa 2 ml Medium resuspendiert und die Konzentration der Zellen mittels Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Durch Variation der μ l-Anzahl konnte jetzt die im Pipettierschema festgelegte Anzahl an Feeder-Zellen in vorbereitete Petri-Schalen mit ca. 13 ml des für die Zelllinie geeigneten Mediums gegeben werden. Für jeden Messwert wurden drei Petri-Schalen pro Versuch angesetzt. Die Feeder layer wurde anschließend für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

An nächsten Tag wurde eine Kulturflasche mit Testzellen der entsprechenden Zelllinie ausgesucht, die Zellen vom Boden der Flasche abgelöst und zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet konnte nun in 1-2 ml Medium aufgenommen und die Konzentration der Zellen bestimmt werden. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 2×10^4 Zellen/ml verdünnt, hiervon jeweils 4 ml in Röhrchen pipettiert und diese dann am Cobalt-Gerät mit der entsprechenden Dosis bestrahlt. Sofort nach der Bestrahlung wurde die

gewünschte Zahl an Testzellen zu der Feeder layer in die entsprechenden Petri-Schalen gegeben. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen für 14-21 Tage im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Wachstumszeit wurde das Medium in den Petri-Schalen vorsichtig abgesaugt und für 10 Minuten ca. 6 ml frisches Fixativ (Methanol/Essigsäure = 3/1; -20°C) auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde einmal mit 6 ml destilliertem Wasser gespült und die Zellen dann für etwa 15 Minuten mit 6 ml 0,6%igem Kristallviolett gefärbt. Nach Abspülen des Farbstoffes mit H_2O_{dest} wurden die Petri-Schalen an der Luft getrocknet.

Der Ablauf des Kolonietests ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt.



2.3.2 Auswertung

Als „Kolonie“ wurden spiralförmige Zellansammlungen aus mehr als 30 Zellen definiert. Die Kolonien waren schon makroskopisch vor hellem Hintergrund sichtbar. Jeder Versuch wurde pro Zelllinie dreimal durchgeführt und die Mittelwerte der Einzelversuche zur Auswertung verwendet.

Zur Darstellung der Überlebenskurven wurde die Fraktion überlebender Zellen jeweils normiert und dann logarithmisch gegen die Bestrahlungsdosis aufgetragen. Den Kurven liegt das linear-quadratische Modell (LQ-Modell)

$$SF = \exp(-\alpha \times D - \beta \times D^2) \quad \text{[Gleichung 1]}$$

zugrunde. **SF** („surviving fraction“) steht für die Fraktion überlebender Zellen, **D** ist die jeweils applizierte Bestrahlungsdosis; α (Einheit Gy^{-1}) und β (Einheit Gy^{-2}) sind zell- bzw. gewebespezifische Konstanten. Durch die lineare Komponente ($-\alpha D$) wird die Anfangsneigung der Überlebenskurve, durch die quadratische Komponente ($-\beta D^2$) die Krümmung der Kurve dargestellt [Hermann et al., 1997]. Folgende weitere Parameter wurden zur Darstellung der Ergebnisse genutzt: Die **CFE** (colony forming efficiency) gibt an, welcher Anteil unbestrahlter Zellen die Fähigkeit besaß, eine Kolonie zu bilden. Mit dem Parameter **SF2** („surviving fraction at 2 Gy“) wird ausgedrückt, welcher Anteil Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy noch die Fähigkeit zur Koloniebildung besaß. Er hat sich als charakteristisches Merkmal zur Beschreibung der Strahlensensibilität von Zellen im Kolonietest etabliert.

2.4 Mikrokern-Assay

2.4.1 Versuchsdurchführung

Der Mikrokern-Assay wurde mit jeder Zelllinie dreimal durchgeführt. Pro Versuch wurden zwei Kulturflaschen einer Zelllinie mit noch nicht konfluent wach-

senden Zellen der gleichen Passage ausgewählt. Die Zellen wurden trypsiniert und gleichmäßig in fünf Kulturflaschen umgesetzt, die anschließend für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Danach wurde in jede Kulturflasche Cytochalasin B (Endkonzentration 5 µg/ml) gegeben und die Zellen 15 Minuten später mit 1, 2, 3 und 4 Gy an einem Cobalt-Telegamma-Gerät (⁶⁰Co-Theratron 780C, Philips, Crowley, Großbritannien) bestrahlt. Die fünfte Flasche blieb als Kontrolle unbestrahlt. Die Karzinomzellen (CHOR, GLIO, MEL) wurden nun für 24 Stunden und die Fibroblasten (117HF, 118HF, HFs, FA, AT) für 48 Stunden inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.6). Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und der Überstand bis auf etwa 600 µl abgesaugt. Die so vorbereiteten Zellen wurden mittels Cytospin-Zentrifuge (5 Minuten, 1100 Umdrehungen/Minute) auf Objektträger aufgebracht. Danach wurden die Objektträger sofort in Küvetten mit -20°C kaltem Methanol zur Fixation gestellt. Nach mindestens einstündiger Aufbewahrung in Methanol wurden sie dann mit einer Acridine Orange-Färbelösung (0,0063%) 5 Minuten lang angefärbt. Hinterher wurde überschüssiger Farbstoff durch zweimaliges, 3 Minuten langes Entfärben in Sörensen-Puffer (0,066 M NaH₂PO₄; 0,066 M KH₂PO₄; pH 6,8) wieder entfernt.

Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt.

2.4.2 Auswertung

Angefärbte Objektträger wurden sofort ausgewertet. Die Auswertung fand mittels eines Auflichtfluoreszenzmikroskops (Leica, DMLB) bei 400facher Vergrößerung statt. Als Lichtquelle wurde eine Quecksilberdampflampe (Osram, HBO 50W/AC) verwendet, als Filter dienten ein Anregungsfilter von 450-490 nm und ein Sperrfilter von 515 nm.

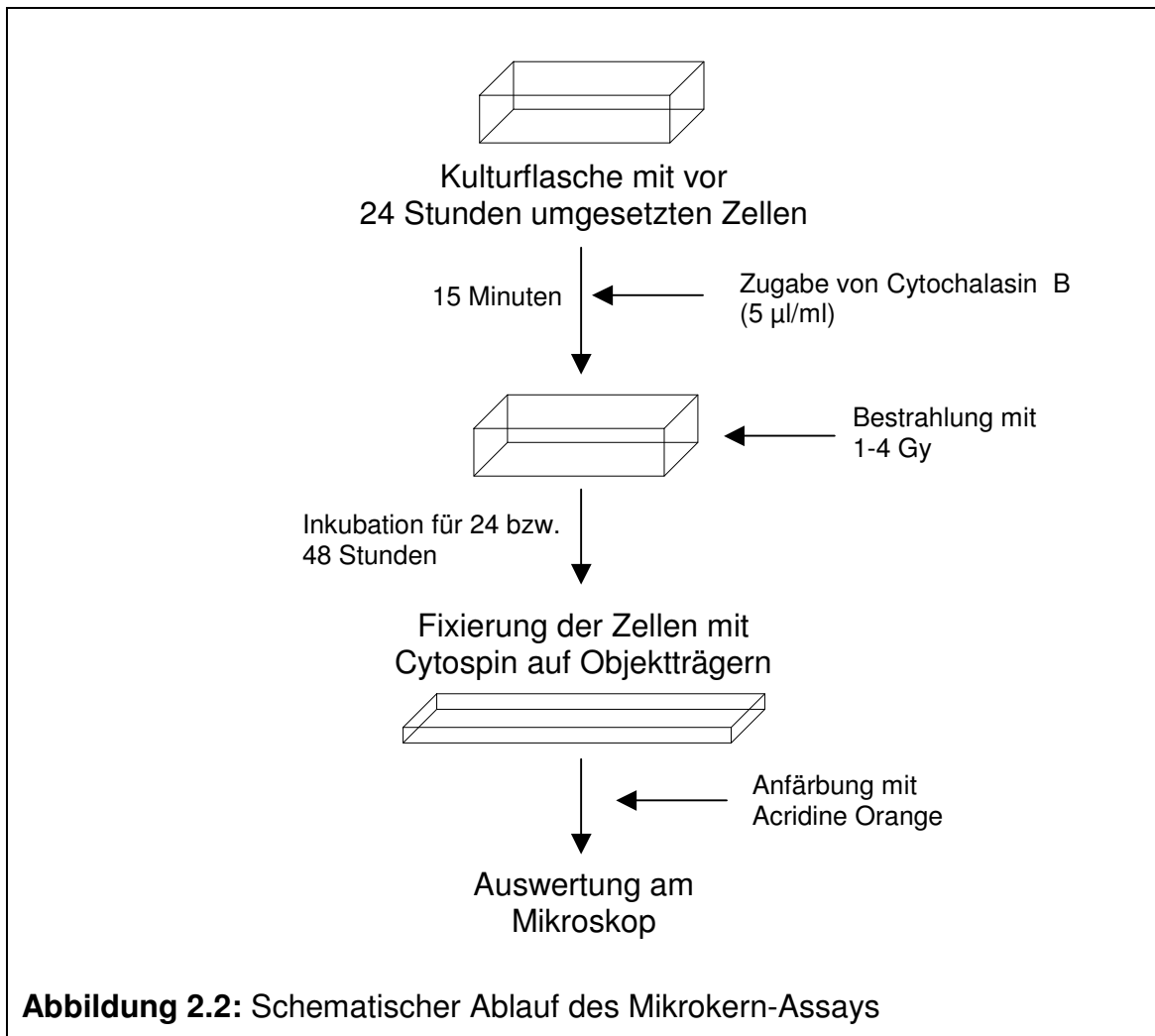
Zur Bestimmung der Mikrokernfrequenz wurden pro Messwert etwa 1000 doppelkernige Zellen (DKZ) zufällig ausgewählt und auf das Vorliegen von Mikrokernen untersucht. Dabei wurden nur vom Kern völlig getrennt liegende

Kernbruchstücke als Mikrokerne gewertet [Fenech et al., 1985]. Zellen mit mehr als zwei Zellkernen wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Der Prozentsatz an mikrokernhaltigen Zellen ergibt sich aus der Formel:

$$\text{Anteil DKZ}_{\text{MK}} (\%) = \text{DKZ}_{\text{MK}} / \text{DKZ} \times 100 \quad [\text{Gleichung 2}]$$

Zur Berechnung der Mitoserate wurden 2000 Zellen ausgezählt und das Verhältnis von einkernigen zu doppelkernigen Zellen bestimmt.



2.5 Comet-Assay

2.5.1 Versuchsdurchführung

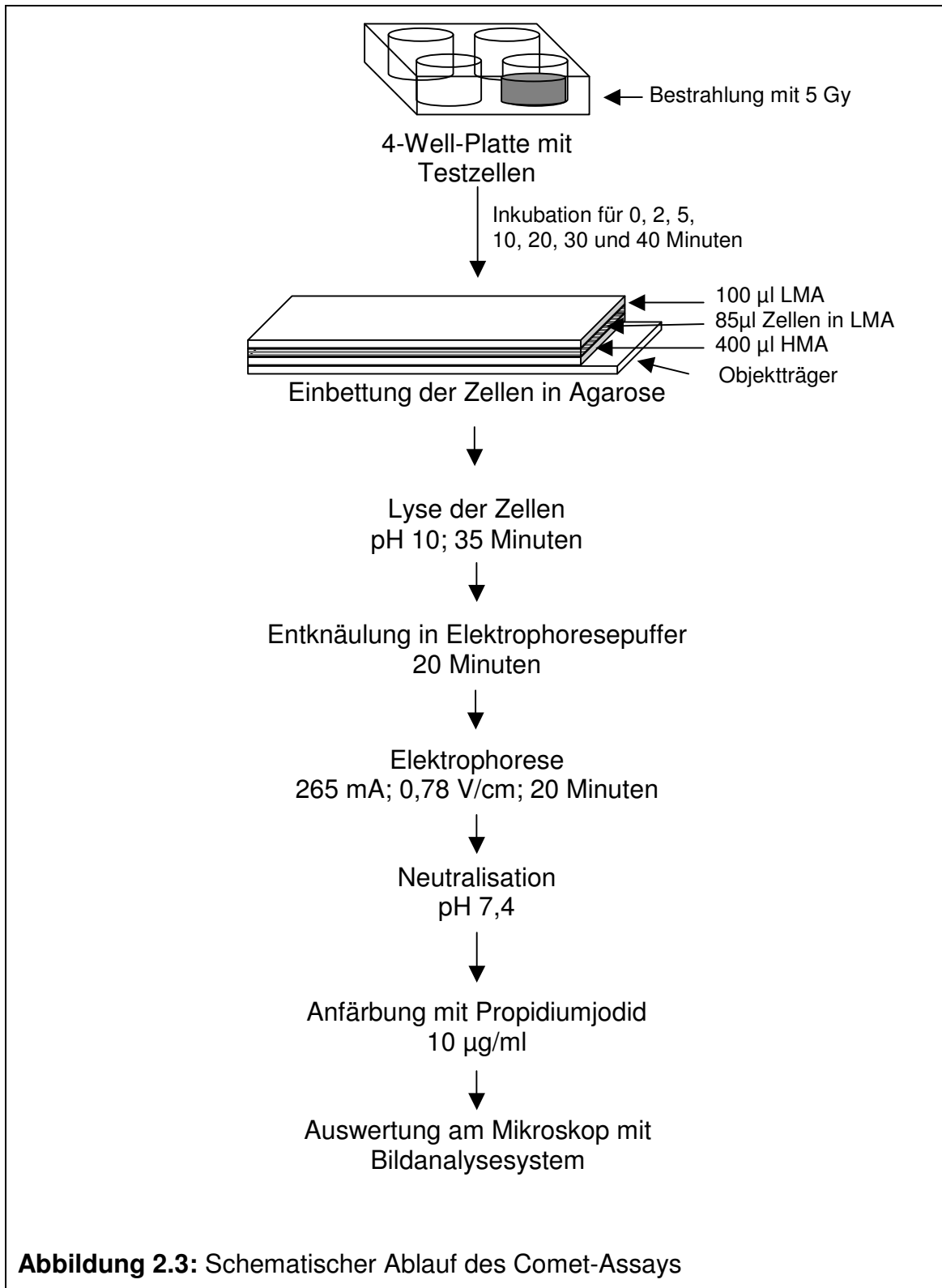
Der Comet-Assay wurde mit jeder Zelllinie zweimal durchgeführt. Für jeden Versuch wurden zwei Kulturflaschen einer Passage mit konfluent wachsenden Zellen ausgewählt. Die Zellen wurden trypsinisiert und nach Zentrifugation das Zellpellet in so viel Medium aufgenommen, dass die entstandene Suspension etwa eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml enthielt. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten in einem Zentrifugenröhrchen in den Brutschrank zurückgestellt, damit sie präparationsbedingte Schäden beheben konnten. In der Zwischenzeit wurden Objektträger mit einer Schicht aus 400 µl high melting agarose (HMA; 0,9% in PBS) überzogen, sofort ein Deckglas aufgelegt und die Objektträger zur Aushärtung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur Erstellung von Kontrollwerten wurden 100 µl Zellsuspension mit 400 µl 37°C warmer low melting agarose (LMA; 0,6% in PBS) vermischt und 85 µl hiervon auf die entsprechenden Objektträger als zweite Agaroseschicht pipettiert. Die Objektträger wurden anschließend mit einem Deckglas bedeckt und auf Eis gestellt. Die restlichen Zellen wurden, damit sie ihren Stoffwechsel vor der Bestrahlung weitgehend einstellten, für die nächsten 10 Minuten auf Eis aufbewahrt.

Nach dieser Zeit konnten sie auf Eis stehend in einer 4-Well-Platte mit 5 Gy am Linearbeschleuniger Primus M (Siemens 6 MV, Concord, CA, USA, Dosisleistung 2 Gy/Minute) bestrahlt werden. Sofort nach der Bestrahlung wurden für den „0-Wert“ wie bei den Kontrollwerten beschriebenen Zellen mit LMA vermischt und als zweite Schicht auf die Objektträger gegeben. Die Objektträger wurden sofort wieder mit einem Deckglas bedeckt und so auf das Eis zurückgestellt. Die übrigen bestrahlten Zellen wurden von der 4-Well-Platte in ein Zentrifugenröhrchen überführt und in einem Becherglas mit warmem Wasser in den Brutschrank gestellt, damit sie die entstandenen Strahlenschäden reparieren konnten. Nach 2, 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten wurden für die weiteren Messwerte erneut 100 µl der Zellsuspension entnommen und wie oben beschrieben die Objektträger für die weiteren Messwerte präpariert, auf Eis gestellt und somit

die Reparaturvorgänge in den Zellen gestoppt. Nach 10 Minuten Aushärtungszeit konnten die Deckgläser der Objektträger vorsichtig abgezogen und eine dritte Schicht Agarose, bestehend aus 100 µl LMA aufgetragen werden.

Zur Lyse der Zellen wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger für 35 Minuten in eiskalten Lysepuffer (2,5 M NaCl; 100 mM Na₂EDTA; 10 mM Tris; pH 10; frisch hinzugefügt: 1% Triton X-100 und 10% Dimethylsulfoxid) gestellt. Nach der Lyse wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült und für 20 Minuten in Küvetten mit 4°C kaltem, frisch zubereiteten Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH; 1 mM EDTA; pH 13,5) gestellt, was zu einer Entknäulung der Tertiärstruktur der DNS führen sollte. Anschließend wurden Objektträger jeden Messwertes ausgewählt, in die Elektrophoresekammer gelegt und etwa 0,5 cm hoch mit neuem Elektrophoresepuffer bedeckt. Nach weiteren 20 Minuten zur Anpassung der Objektträger an das umgebende Milieu wurde die Elektrophorese (265 mA; 0,78 V/cm; 20 Minuten) durchgeführt. Diese bewirkt eine Wanderung der negativ geladenen DNS-Bruchstücke in Richtung der Anode. Je nach Zahl der DNS-Strangbrüche, bzw. Entspiralisierung und Schlaufenbildung der DNS, entstehen so mehr oder weniger stark ausgeprägte Schweife hinter den Zellen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Kammer genommen und mehrmals für einige Minuten mit Neutralisationspuffer (0,4 M Tris; pH 7,5) bedeckt und abgespült. Anschließend konnten die Kometen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (10 µg/ml) angefärbt werden. Alle Arbeitsschritte wurden soweit möglich unter Lichtabschluss durchgeführt, um zusätzliche DNS-Schäden zu vermeiden.

Abbildung 2.3 zeigt schematisch den Ablauf des Comet-Assays.



2.5.2 Auswertung

Die angefärbten Präparate wurden mit Hilfe eines Auflichtfluoreszenzmikroskops (Leica, DMLB) ausgewertet. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampfampe (Osram, HBO 50W/AC). Es wurde ein Anregungsfilter von 515-560 nm und ein Sperrfilter von 590 nm verwendet. Das Mikroskop war mit einem Personalcomputer verbunden. Die Bildverarbeitungssoftware Komet Analysis (Version 3.1 Europe, Kinetic Imaging Ltd., Großbritannien) lieferte die Rohwerte der Kometen, welche mit dem Kinetic Analysis Macro for Excel (Kinetic Imaging Ltd., Großbritannien) weiter verarbeitet wurden.

Pro Objektträger wurden 75 Zellen zufällig ausgewählt und analysiert. Nekrotische oder apoptotische Zellen, sowie Zellen direkt vom Rand der Objektträger, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Mit dem hier verwendeten Comet-Assay sollte besonders die Reparaturkinetik der Zelllinien untersucht werden. Zur quantitativen Auswertung der Kometen wurde das „Olive Tail Moment (TM)“ genutzt [Olive et al., 1990]. Es ist definiert als Produkt aus Prozent an DNS im Kometen-Schweif und Schweiflänge:

$$\text{Tail moment (TM)} = \text{DNS im Schweif (\%)} \times \text{Schweiflänge} \quad [\text{Gleichung 3}]$$

Abbildung 2.4 zeigt das typische Bild eines Kometen.

Aus dem TM der 75 ausgewerteten Zellen wurde der Mittelwert und der Standardfehler errechnet. Zur Darstellung des Reparaturverlaufs wurde in einem Diagramm das TM gegen die Reparaturzeit aufgetragen. Den Graphen liegt die monoexponentielle Funktion

$$\text{TM}(t) = \text{TM}_0 \times \exp(-0,693t / t_{0,5}) + \text{TM}_R \quad [\text{Gleichung 4}]$$

zugrunde.

TM_0 ist der initiale, noch reparable DNS-Schaden, TM_R der nach 40 Minuten noch vorhandene DNS-Residualschaden, t die Inkubationszeit nach der Bestrahlung. Der Parameter $t_{0.5}$ gibt die Reparaturhalbwertszeit wieder, also die Zeit in der 50% des zunächst vorhandenen Schadens repariert werden konnte.

Als weiterer Parameter wurde das initiale gesamte TM (TM_{IT}) verwendet. Er ergibt sich durch Addition des residualen TM (TM_R) und des reparablen TM (TM_0). Es gilt:

$$TM_{IT} = TM_0 + TM_R \quad \text{[Gleichung 5]}$$

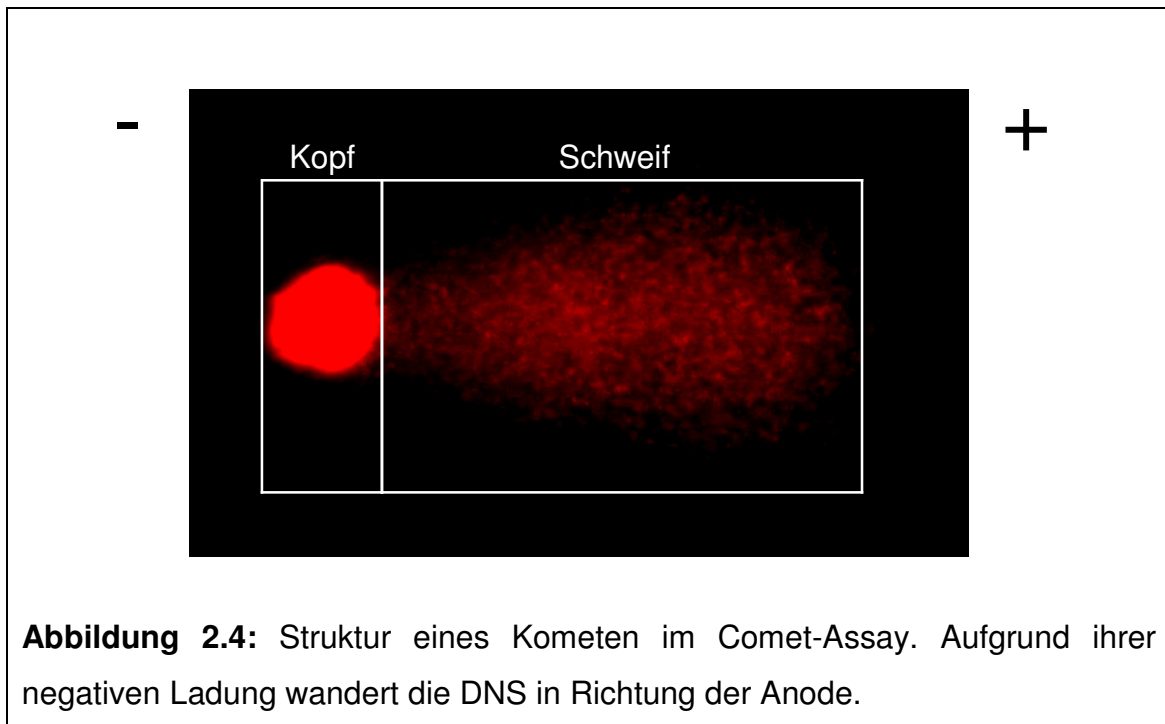


Abbildung 2.4: Struktur eines Kometen im Comet-Assay. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandert die DNS in Richtung der Anode.

3 Ergebnisse

3.1 Klonogene Überlebensraten von Zellen nach Röntgenbestrahlung

3.1.1 Koloniewachstum von Zellen im Kolonietest

Die folgenden Bilder zeigen das Koloniewachstum der Zelllinie 117HF als Beispiel für die Fibroblasten und der Zelllinie CHOR als Beispiel für die Tumoren.

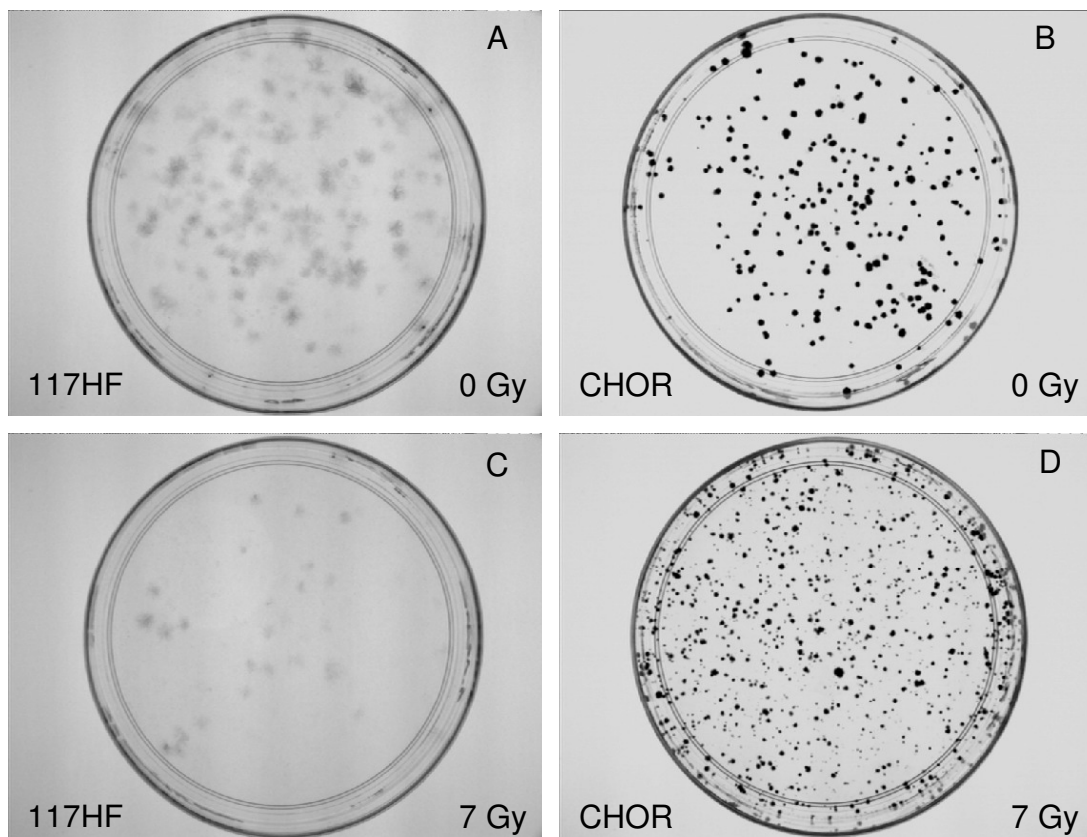


Abbildung 3.1: Zellwachstum der Zelllinien 117HF und CHOR. Die oberen Petri-Schalen (A, B) enthalten 500 unbestrahlte Testzellen, die unteren (C, D) 15000 Zellen, die mit 7 Gy bestrahlt wurden.

In die abgebildeten Petri-Schalen wurde, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, eine unterschiedliche Anzahl an Testzellen eingesetzt. Bei den unbestrahlten Zellen wurden 500 Testzellen zu einer Feeder layer dazugegeben. Im Ansatz der mit 7 Gy bestrahlten Zellen wurden 15000 Testzellen eingesetzt. Trotz der deutlich höheren Anzahl an Testzellen war das Koloniewachstum der Zelllinie 117HF nach einer Bestrahlung mit 7 Gy stark vermindert. Die Zellen der Zelllinie CHOR zeigten ein kompakteres Wachstum als die Fibroblasten. Besonders im Vergleich mit der Zelllinie 117HF fiel eine deutlich größere Resistenz der Karzinomzellen gegenüber der Bestrahlung mit 7 Gy auf.

3.1.2 Koloniebildungsfähigkeit unbestrahlter Zellen

Die CFE (colony forming efficiency) entspricht dem Anteil unbestrahlter Zellen, der die Fähigkeit besitzt, in den Petri-Schalen Kolonien zu bilden. Abbildung 3.2 zeigt, beginnend mit den Zellen mit der höchsten Überlebensrate, die CFE jeder Zelllinie. Absolute Werte sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Die größte Effizienz der Koloniebildung zeigte das Chorionkarzinom mit 57,4%, gefolgt vom Glioblastom mit 34,9%. Etwa halb so groß war die CFE der Zelllinie 118HF. Mit einer CFE von 10,6-13,7% folgten die Zelllinien AT, HFs, MEL und 117HF. Die geringste Fähigkeit Kolonien zu bilden zeigte die Zelllinie des Fanconi-Anämie-Patienten.

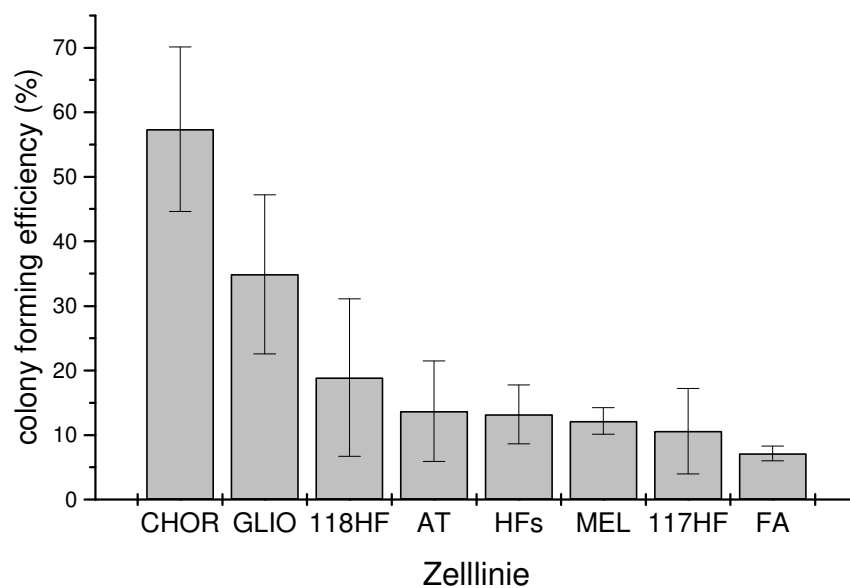


Abbildung 3.2: Koloniebildungsfähigkeit unbestrahlter Zellen aller Zelllinien. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Versuchen an.

3.1.3 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Alle Zelllinien, abgesehen von den AT-Zellen, wurden mit 1, 2, 3, 5, 7 und 8 Gy bestrahlt und eine bestimmte Zellzahl in Petri-Schalen eingesetzt. Für die AT-Zellen wurde eine angepasste Strahlendosis verwendet (siehe Tabelle 2.2). Auf diese Weise konnte für jede Dosis der Anteil koloniebildender Zellen errechnet werden.

Die Fraktion koloniebildender Zellen aufgetragen gegen die Bestrahlungsdosis führt zu der in Abbildung 3.3 dargestellten Dosis-Wirkungs-Beziehung. Den Kurven liegt das linear-quadratische Modell [Gleichung 1] zugrunde. Die Parameter α und β sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

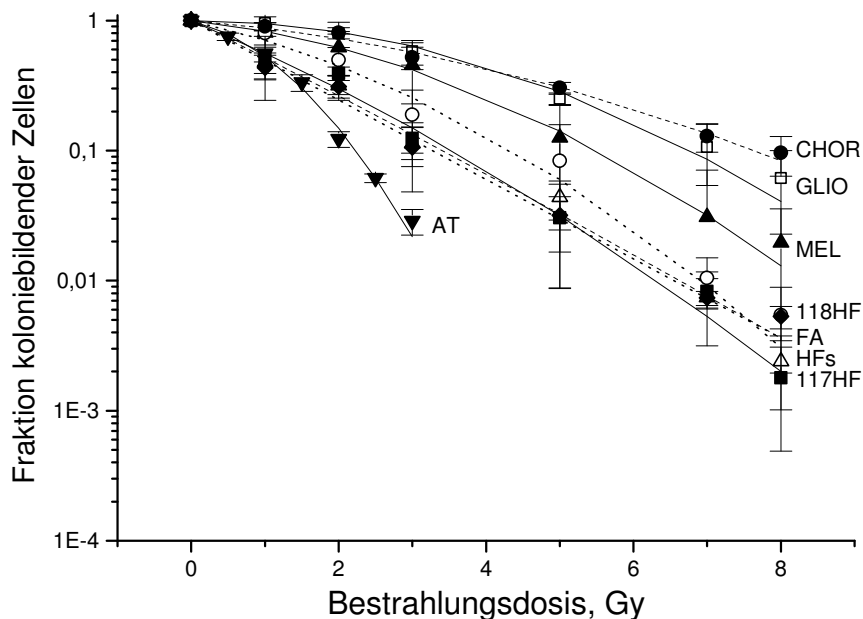


Abbildung 3.3: Fraktion koloniebildender Zellen nach Bestrahlung mit Dosen zwischen 0 und 8 Gy. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus drei Einzelversuchen mit jeder Zelllinie dar.

Aus dem Kurvenverlauf in Abbildung 3.3 wird deutlich, dass die Zellen des Chorionkarzinoms und des Glioblastoms im Kolonietest am strahlenresistentesten erschienen. Auch die dritte Tumorzelllinie, das Melanom, zeigte eine recht hohe klonogene Überlebensrate.

Von den Fibroblastenzelllinien waren die Zellen 118HF bei einer Bestrahlungsdosis von 1 bis 5 Gy am resistantesten. Nach Bestrahlung mit 7 und 8 Gy unterschieden sie sich jedoch kaum von den anderen Fibroblasten. Mit Abstand am sensibelsten reagierte die Zelllinie des AT-Patienten.

Der Parameter SF2 („surviving fraction at 2 Gray“) der einzelnen Zelllinien aus Abbildung 3.3 wird im folgenden Balkendiagramm (Abbildung 3.4) zur besseren Übersicht noch einmal dargestellt.

Tabelle 3.1: Effizienz der Koloniebildung (**CFE**), Parameter α und β des linear-quadratischen Fit und Fraktion überlebender Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy (**SF2**) im Kolonietest

	CFE (%)	α (Gy^{-1})	β (Gy^{-2})	SF2
117HF	10,6 ±6,6	0,55 ±0,08	0,03 ±0,02	0,30
118HF	18,9 ±12,2	0,29 ±0,08	0,05 ±0,02	0,45
HF _s	13,2 ±4,6	0,66 ±0,06	0,01 ±0,01	0,26
FA	7,2 ±1,1	0,70 ±0,03	0,00 ±0,00	0,25
AT	13,7 ±7,8	0,31 ±0,09	0,32 ±0,05	0,15
CHOR	57,4 ±12,7	0,11 ±0,03	0,03 ±0,01	0,73
GLIO	34,9 ±12,3	0,06 ±0,02	0,04 ±0,01	0,76
MEL	12,2 ±2,1	0,14 ±0,03	0,05 ±0,01	0,62

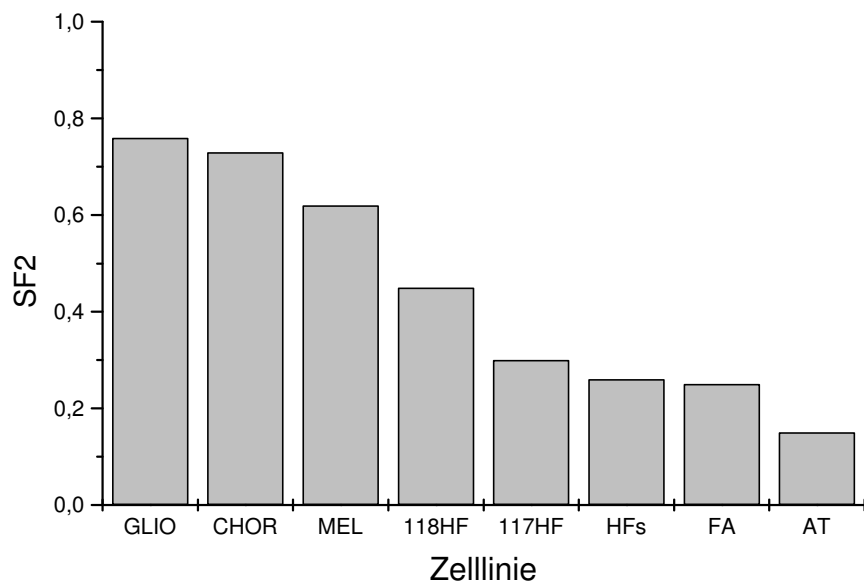
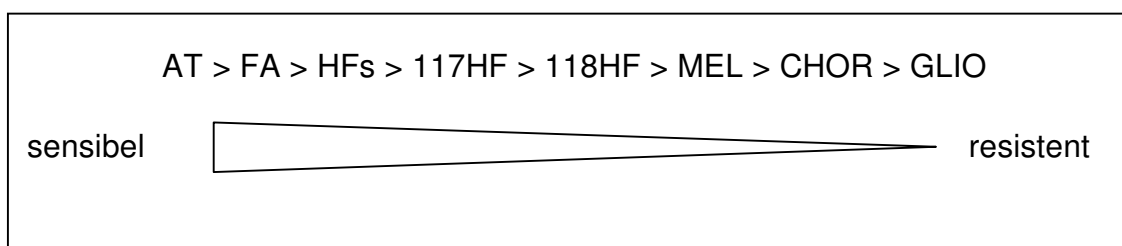


Abbildung 3.4: Relativer Anteil überlebender Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy (SF2). Die Balken zeigen aus der LQ-Fitkurve durch die Mittelwerte von drei Einzelversuchen errechnete SF2-Werte (siehe Tabelle 3.1).

Deutlich zeigt sich die Strahlenresistenz der drei Tumorzelllinien GLIO, CHOR und MEL. Strahlensensibler waren die Fibroblasten 118F und 117F der klinisch normal auf eine Bestrahlung reagierenden Patienten. Die drei Zelllinien mit den Syndromen AT, AT-ähnlich und FA reagierten am sensibelsten auf die Bestrahlung mit 2 Gy.

Ahnhand des Parameters SF2 scheint die Strahlensensibilität der Zelllinien folgende Reihenfolge aufzuweisen:



3.2 Auswirkung von ionisierender Strahlung auf die Bildung von Mikrokernen

3.2.1 Typisches Erscheinungsbild von Zellen im Mikrokern-Assay

Abbildung 3.5 zeigt repräsentative Zellen der Zelllinien AT und MEL im Mikrokern-Assay. Die Fibroblasten wurden nach der Bestrahlung 48 Stunden lang inkubiert, die Tumorzellen 24 Stunden (siehe Abschnitt 3.2.6).

Sowohl die AT- als auch die Melanomzellen zeigten unbestrahlt vereinzelt Mikrokerne (Abbildung 3.5 A, B). Nach Bestrahlung mit 4 Gy waren bei den AT-Zellen weniger doppelkernige Zellen zu sehen als in der unbestrahlten Kontrolle (Abbildung 3.5 C). Die Melanomzellen hingegen hatten sich trotz einer kürzeren Inkubationszeit zum Teil schon mehrfach geteilt, wodurch vielkernige Zellen in Erscheinung traten (Abbildung 3.5 D). In vielen Melanomzellen wurden nach der Bestrahlung mit 4 Gy gleich mehrere Mikrokerne sichtbar.

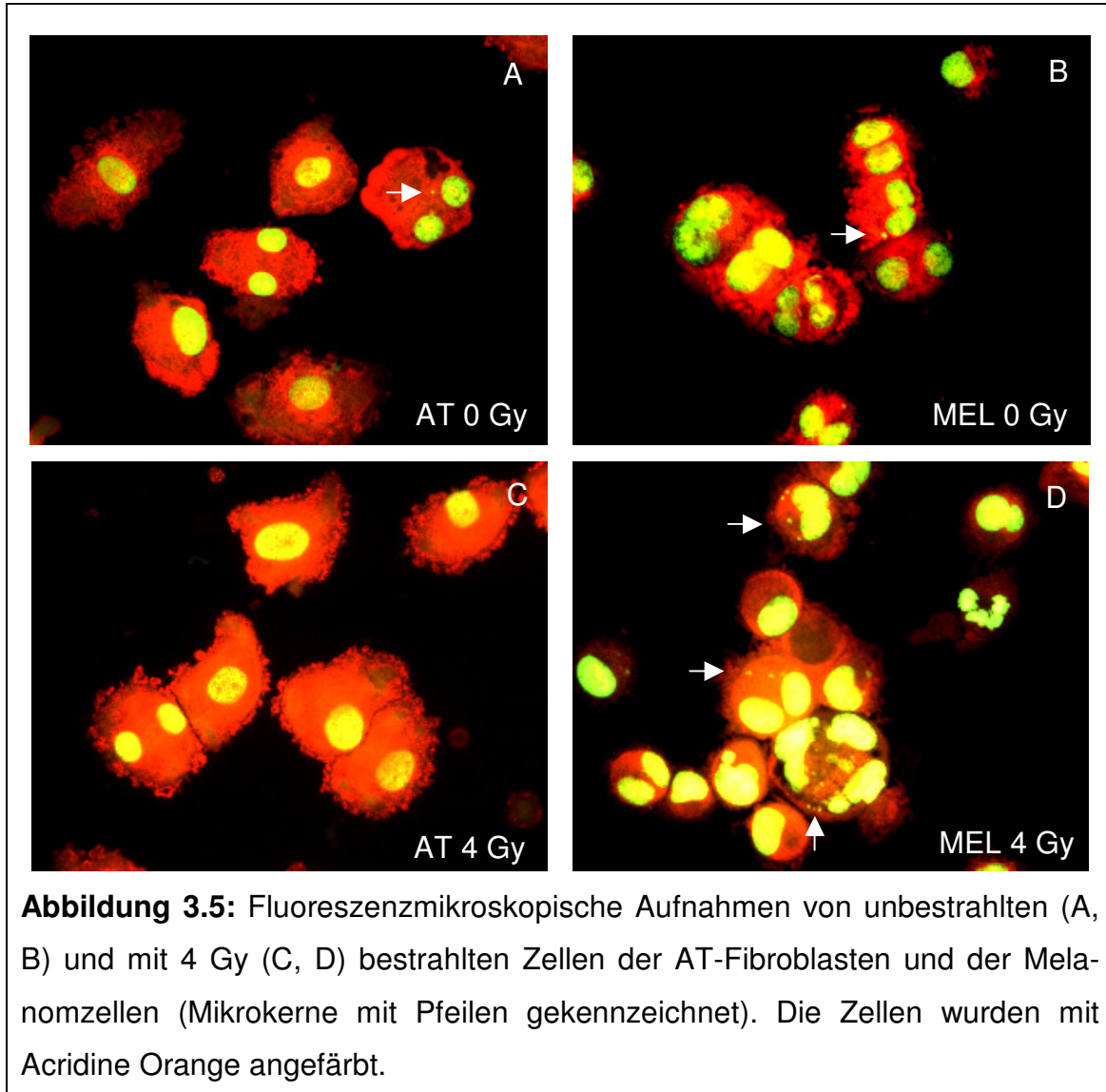


Abbildung 3.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unbestrahlten (A, B) und mit 4 Gy (C, D) bestrahlten Zellen der AT-Fibroblasten und der Melanomzellen (Mikrokern mit Pfeilen gekennzeichnet). Die Zellen wurden mit Acridine Orange angefärbt.

3.2.2 Spontane Mikrokernfrequenz

Die spontane Mikrokernfrequenz wurde aus dem Anteil DKZ mit Mikrokerneln von unbestrahlten Zellkulturen errechnet. Den höchsten Anteil an mikrokernhaltigen Zellen wies die Zelllinie des Melanoms mit $14,5 \pm 3,2\%$ aus. Es folgte die Zelllinie des AT-Patienten mit $11,1 \pm 3,6\%$. Danach kamen die Zellen der beiden anderen Karzinome CHOR und GLIO. Die übrigen Fibroblastenzelllinien zeigten eine nur geringe spontane Mikrokernfrequenz mit Werten zwischen $1 \pm 0,6\%$ und $3,2 \pm 0,4\%$ auf (Tabelle 3.2).

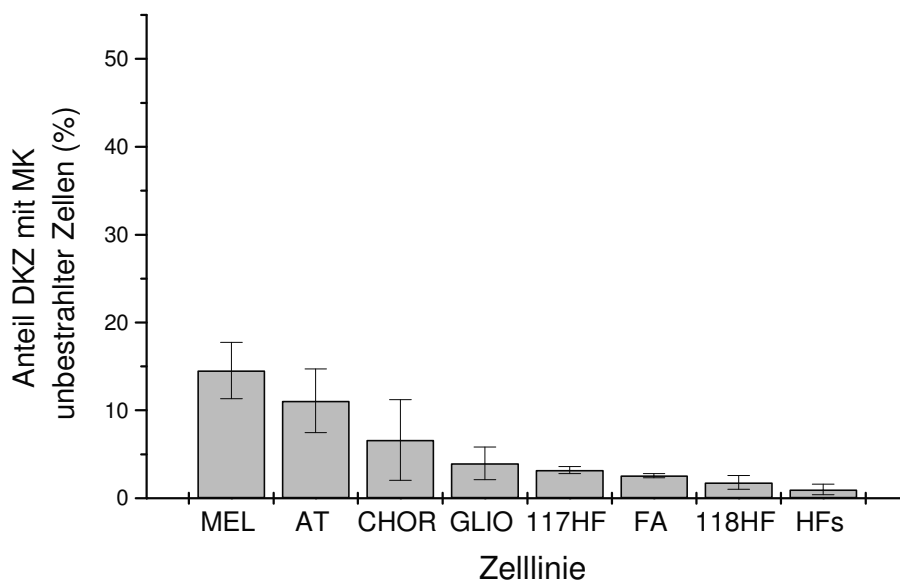
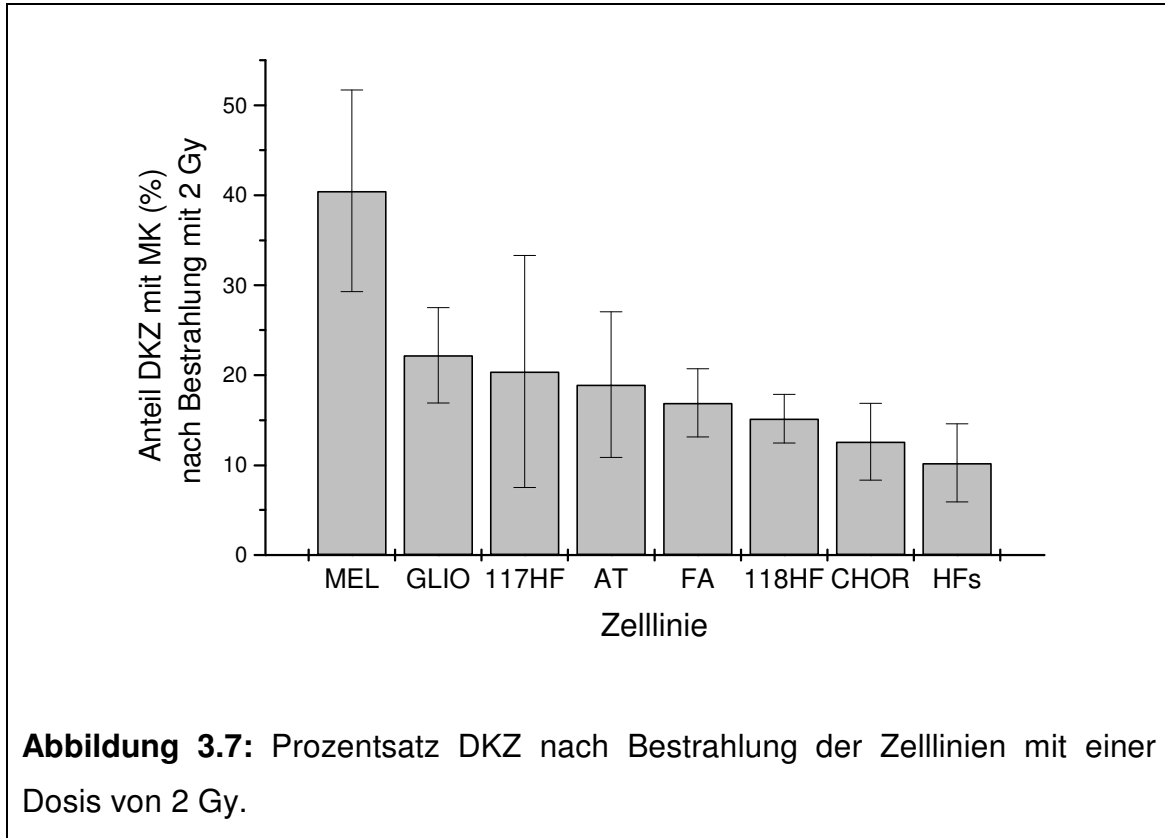


Abbildung 3.6: Spontane Mikrokernfrequenz unbestrahlter Zellen im Mikrokern-Assay. Die Standardabweichung ergibt sich aus den Ergebnissen von drei unabhängigen Einzelversuchen.

3.2.3 Mikrokernfrequenz nach Bestrahlung mit 2 Gy

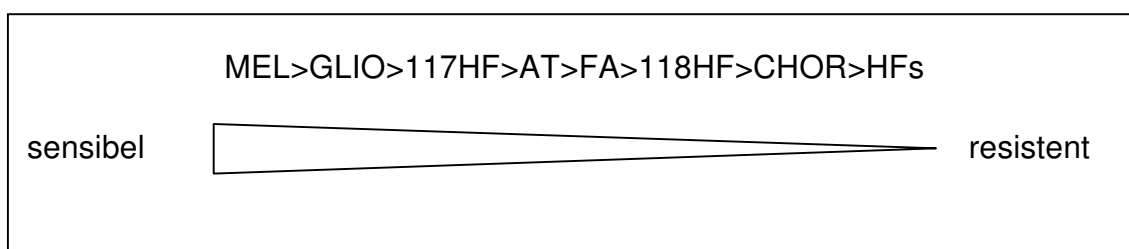
Analog zu den SF2-Werten im Kolonietest ist in Abbildung 3.7 der Anteil mikrokernhaltiger Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy dargestellt.

Der niedrigste Prozentsatz mikrokernhaltiger Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy zeigte sich mit $10,2 \pm 4,4\%$ bei der Zelllinie HF's des Patienten mit dem AT-ähnlichen Syndrom. Mit geringem Abstand folgte die Zelllinie des Chorionkarzinoms mit einem Mikrokernanteil von $12,6 \pm 4,3\%$. Abgesehen von den Zellen des malignen Melanoms wiesen die anderen Zelllinien eine Mikrokernfrequenz zwischen 15% und 22% auf. Das Melanom besaß einen deutlich höheren Anteil mikrokernhaltiger Zellen. Lag die Frequenz der Mikrokerne der unbestrahlten Melanomzellen schon bei 14,5%, so stieg sie nach Bestrahlung mit 2 Gy auf 40,5% an.



Betrachtet man die Frequenz der mikrokernhaltigen Zellen als Indikator für Strahlenempfindlichkeit, so lässt sich eine Rangfolge der Zelllinien erstellen.

Rangfolge der Strahlenempfindlichkeit nach Bestrahlung mit 2 Gy:



Die genauen Prozentwerte für alle Zelllinien und die Standardabweichungen können der Tabelle 3.2 entnommen werden.

3.2.4 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der absoluten Mikrokernwerte

Bei allen Zelllinien stieg die Mikrokernfrequenz mit zunehmender Strahlendosis an (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Prozentualer Anteil DKZ mit Mikrokernen nach Bestrahlung mit 0 bis 4 Gy. Die Standardabweichung ergibt sich aus drei unabhängigen Versuchen.

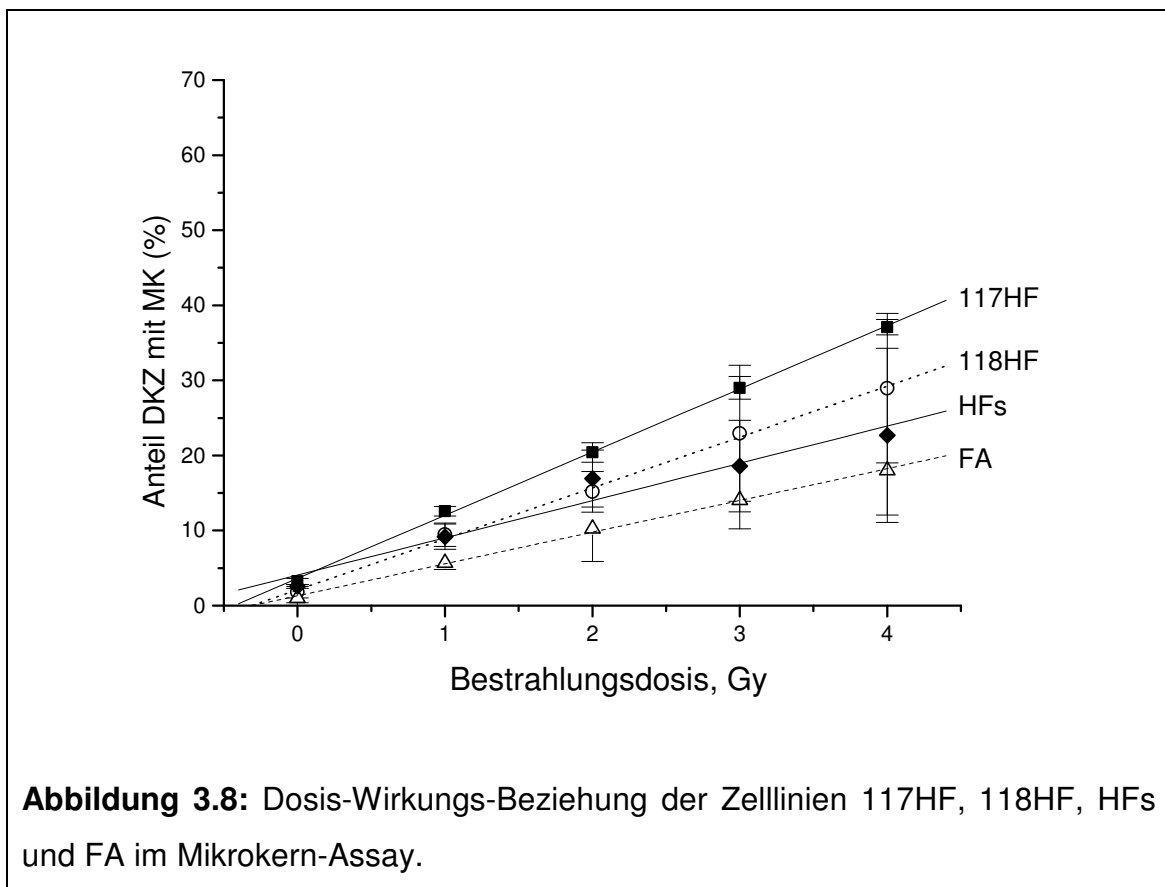
	0 Gy	1 Gy	2 Gy	3 Gy	4 Gy
117HF	3,2 ±0,4	12,6 ±0,7	20,4 ±12,9	29,0 ±1,5	37,1 ±1,0
118HF	1,8 ±0,8	9,5 ±1,6	15,2 ±2,7	23,0 ±9,1	29,0 ±10,0
HF _s	1,0 ±0,6	5,7 ±0,8	10,2 ±4,4	14,0 ±3,8	18,0 ±5,9
FA	2,6 ±0,3	9,2 ±1,7	16,9 ±3,8	18,6 ±6,1	22,7 ±11,6
AT	11,1 ±3,6	14,3 ±2,0	19,0 ±8,1	24,1 ±10,1	23,0 ±7,4
CHOR	6,6 ±4,6	11,1 ±3,9	12,6 ±4,3	14,7 ±2,3	17,7 ±3,4
GLIO	4,0 ±1,9	9,9 ±4,7	22,2 ±5,3	30,2 ±2,6	45,2 ±1,6
MEL	14,5 ±3,2	26,8 ±3,7	40,5 ±11,2	50,1 ±7,6	54,3 ±12,7

Um die Verläufe der einzelnen Dosis-Wirkungs-Beziehungen darzustellen, wurde eine lineare Regressionsgerade ($Y=A+B \times X$) durch die einzelnen Mittelwerte jeder Bestrahlungsdosis gelegt. Der Regressionskoeffizient R lag bei allen Geraden zwischen 0,96 und 1; immer galt $p \leq 0,05$. Daraus folgt, dass bei allen Zelllinien ein linearer Zusammenhang zwischen Mikrokernfrequenz und Bestrahlungsdosis angenommen werden kann (siehe Tabelle 3.3).

In Abbildung 3.8 wird die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Mikrokern-Bildung der Zelllinien 117HF, 118HF, HF_s und FA graphisch dargestellt. Zum besseren optischen Vergleich wurde der Graph der Zelllinie 117HF auch in Abbildung 3.9 eingezeichnet.

Tabelle 3.3: Regressionsgerade durch die Mittelwerte der drei Einzelversuche des Mikrokern-Assays. **A** ist der Achsenabschnitt mit Standardabweichung, **B** die Steigung der Geraden mit Standardabweichung, **R** der Regressionskoeffizient.

	A	B	R	p
117HF	3,6 ± 0,3	8,5 ± 0,1	1,00	<0,0001
118HF	2,1 ± 0,4	6,8 ± 0,2	1,00	<0,0001
HF _s	1,3 ± 0,3	4,2 ± 0,1	1,00	<0,0001
FA	4,1 ± 1,6	5,0 ± 0,7	0,98	0,005
AT	11,6 ± 0,5	3,4 ± 0,6	0,96	0,018
CHOR	7,4 ± 0,7	2,6 ± 0,3	0,98	0,002
GLIO	1,7 ± 2,0	10,3 ± 0,8	0,99	0,001
MEL	16,7 ± 2,6	10,3 ± 1,1	0,98	0,002



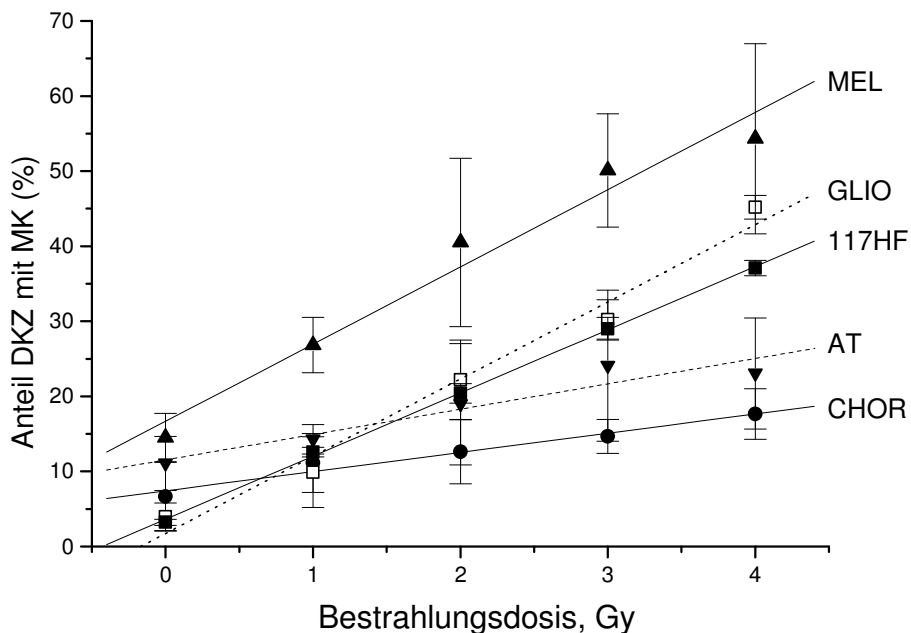
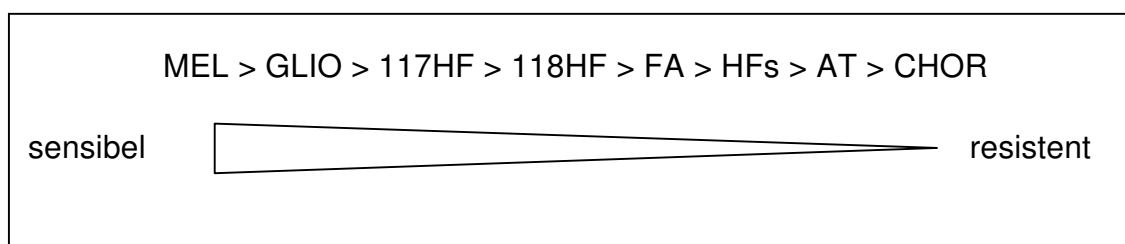


Abbildung 3.9: Dosis-Wirkungs-Beziehungen der drei Tumorzelllinien MEL, GLIO und CHOR sowie der AT-Zellen und zum Vergleich der Zelllinie 117HF.

Auffällig in den Abbildungen 3.8 und 3.9 ist die unterschiedliche Steigung der Regressionsgeraden. Sie spiegelt die Zunahme der Mikrokerne mit steigender Bestrahlungsdosis wider. Bei der Zelllinie des Chorionkarzinoms ist die geringste Zunahme an Mikrokerneln erkennbar. Die Steigung der Geraden liegt bei nur $2,6 \pm 0,3$. Überraschend niedrig ist auch die Zunahme bei der Zelllinie des Patienten mit Ataxia teleangiectasia. Hier beträgt die Steigung nur $3,4 \pm 0,6$ und ist damit am zweit niedrigsten. Die größte Zunahme an Mikrokerneln zeigen die Tumorzelllinien MEL und GLIO.

Betrachtet man den Anstieg der Regressionsgeraden als ein Maß für die Strahlensensibilität einer Zelllinie, so ergibt sich, beginnend mit der größten Steigung, folgende Reihenfolge:

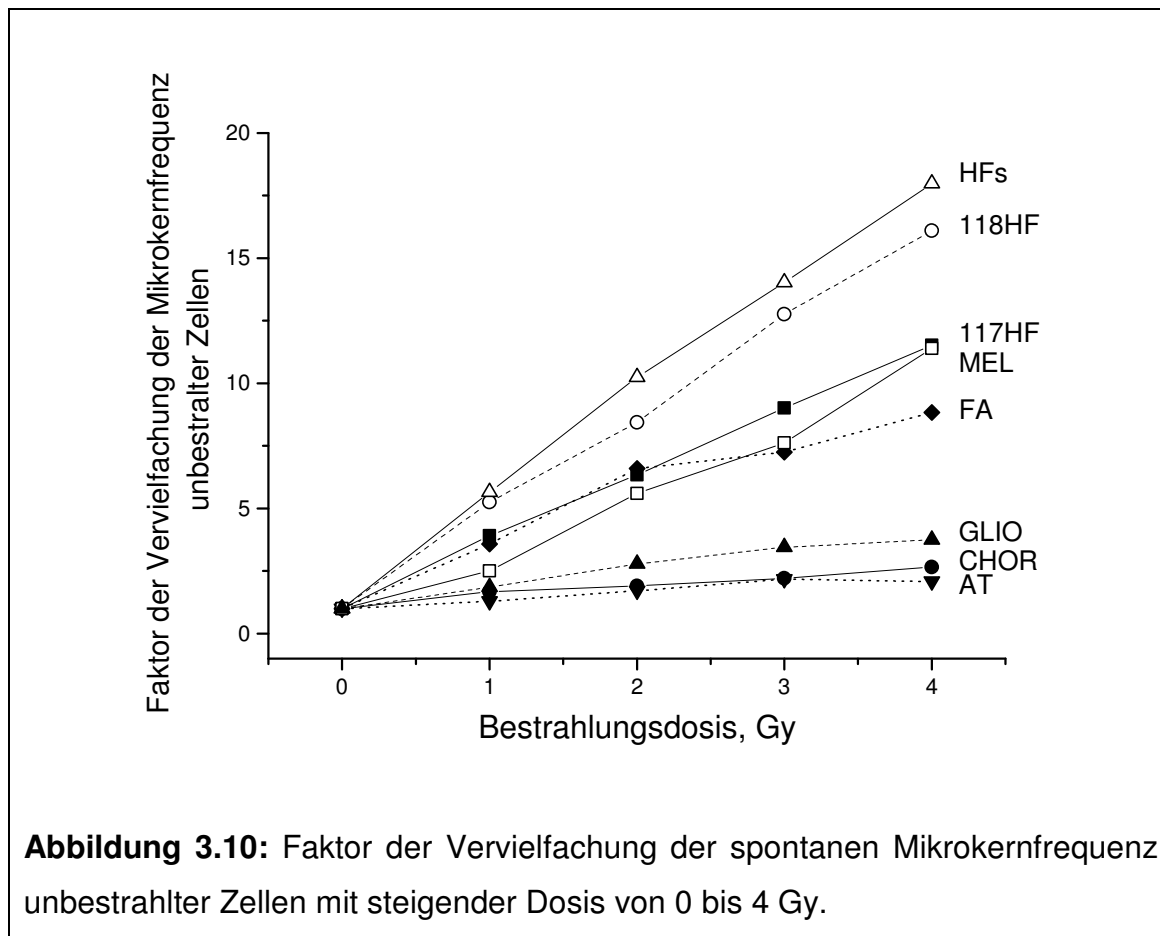


3.2.5 Vervielfachung der spontanen Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit von der Strahlendosis

Eine weitere interessante Analysemöglichkeit ergibt sich aus der Betrachtung der normierten Mikrokernwerte. Nach Division der Mikrokernanteile durch den Wert der spontanen Mikrokernfrequenz unbestrahlter Zellen kann eine Aussage über die Vervielfachung des ursprünglichen Wertes gemacht werden. Es entsteht ein neues Bild von der Reaktion der Zellen auf die Bestrahlung. Tabelle 3.4 gibt den Faktor der Vervielfachung der Mikrokern-Rate für jede Zelllinie bei der entsprechenden Bestrahlungsdosis an, in Abbildung 3.10 ist der Sachverhalt graphisch dargestellt.

Tabelle 3.4: Vervielfachung der spontanen Mikrokernfrequenz im Mikrokern-Assay bei steigender Bestrahlungsdosis. Die Prozentzahlen wurden mittels Division durch die spontane Mikrokernfrequenz unbestrahlter Zellen normiert.

	0 Gy	1 Gy	2 Gy	3 Gy	4 Gy
117HF	1	3,9	6,3	9,0	11,3
118HF	1	5,3	8,4	12,8	16,1
HF _s	1	5,7	10,2	14,0	18,0
FA	1	3,6	6,6	7,3	8,8
AT	1	1,3	1,7	2,8	2,1
CHOR	1	1,7	1,9	2,2	2,7
GLIO	1	2,5	5,6	7,6	11,4
MEL	1	1,9	2,8	3,5	3,7



Nach einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy hatte die Zelllinie HFs ihre spontane Mikrokernfrequenz etwa verzehnfacht (Tabelle 3.4). Der nächst höhere Faktor fand sich bei der Zelllinie 118HF. Mit etwa einer Versechsfachung reagierten die Zellen des Fanconi-Anämie-Patienten, die 117HF und das Glioblastom. Eine deutlich geringere Vervielfachung zeigte sich bei der Zelllinie des Melanoms mit einem Faktor von 2,8, gefolgt von dem Chorionkarzinom. Den niedrigsten Faktor der Vervielfachung wies erstaunlicherweise die Zelllinie des Patienten mit Ataxia teleangiectasia auf. Es fand sich hier nach einer Bestrahlung mit 2 Gy nicht einmal eine Verdopplung der ursprünglichen Mikrokernfrequenz.

3.2.6 Untersuchungen zur Mitoserate mit dem Mikrokern-Assay

Bei den Vorversuchen zur Festlegung der optimalen Versuchsbedingungen des Mikrokern-Assays wurde festgestellt, dass besonders bei den Zellkulturen der Fibroblasten die Mitoserate mit steigender Bestrahlungsdosis rapide abnahm. Daraufhin wurde bei den folgenden Versuchen durch Auszählung von 2000 Zellen das Verhältnis von doppelkernigen Zellen zu einkernigen Zellen bestimmt und so ein Überblick über die Mitoserate der Zellen gewonnen.

Die Tumorzelllinien konnten wegen ihrer hohen Teilungsrate nach der Bestrahlung nur 24 Stunden lang inkubiert werden, da sonst etliche vielkernige Zellen vorhanden waren. Die Fibroblasten benötigten aber eine Wachstumszeit von 48 Stunden, damit ausreichend Zellen doppelkernig waren. Aus diesem Grund müssen die verschiedenen Zellarten im Folgenden getrennt betrachtet werden. Tabelle 3.5 gibt den Anteil Zellen in Prozent an, der nach der jeweiligen Bestrahlungsdosis zwei Kerne besaß, also eine Mitose durchlaufen hatte.

Tabelle 3.5: Prozentualer Anteil DKZ im Mikrokern-Assay nach einer Inkubationszeit von 24 bzw. 48 Stunden.

	0 Gy	1 Gy	2 Gy	3 Gy	4 Gy
Anteil DKZ 48 Stunden nach der Bestrahlung					
117HF	33,6 ±2,7	23,0 ±3,3	16,4 ±0,7	12,0 ±1,4	8,0 ±0,4
118HF	35,7 ±6,1	22,1 ±6,1	12,9 ±4,9	10,0 ±4,9	6,0 ±3,2
HF's	59,9 ±8,3	46,1 ±13,1	29,8 ±12,8	19,9 ±3,1	13,0 ±4,1
FA	21,2 ±1,7	13,6 ±3,8	9,0 ±2,6	7,4 ±3,0	5,9 ±3,1
AT	25,5 ±9,5	20,8 ±10,0	20,1 ±13,0	16,4 ±9,8	17,6 ±13,5
Anteil DKZ 24 Stunden nach der Bestrahlung					
CHOR	87,6 ±5,2	84,8 ±2,1	78,4 ±4,3	75,4 ±8,3	69,6 ±12,7
GLIO	87,2 ±6,5	87,2 ±8,6	85,0 ±8,1	84,3 ±8,5	79,9 ±15,9
MEL	63,4 ±10,1	64,5 ±6,6	65,1 ±10,5	67,6 ±10,5	68,5 ±14,3

Die unbestrahlten Fibroblastenkulturen zeigten nach 48 Stunden einen Anteil DKZ von 21-35%. Im Falle der Zelllinie HFs wurde sogar ein Anteil von fast 60% erreicht. Im Gegensatz dazu waren nach Bestrahlung mit 4 Gy nur noch unter 10% der Zellen der Zelllinien 117HF, 118HF und FA doppelkernig. Die Mitoserate der Zelllinie HFs ging stark zurück auf 13%. Wenig Änderung in der Mitoserate zeigte interessanterweise die Zelllinie AT. Unbestrahlt waren 25,5% der Zellen doppelkernig, nach Bestrahlung mit 4 Gy aber auch immerhin noch 17,6%.

Die Mitoserate der Karzinomzellen lag wesentlich höher. Hier wiesen unbestrahlte Zellen des Chorion-Karzinoms und des Glioblastoms einen Anteil DKZ von etwa 87% auf. Auch nach Bestrahlung mit 4 Gy durchliefen noch 69,6 bzw. 79,4% der Zellen eine Mitose. Die Melanomzellen waren unbestrahlt zu 63,4% doppelkernig und nach Bestrahlung mit 4 Gy zu 68,5%.

Zur besseren Darstellung des Sachverhalts wurden relative Werte errechnet, die angeben, welcher Anteil der ursprünglichen Mitoserate nach Bestrahlung mit der entsprechenden Dosis noch vorhanden ist (Tabelle 3.6, Abbildung 3.11, Abbildung 3.12).

In Abbildung 3.11 fällt der sehr ähnliche Verlauf des Rückgangs der Mitoserate bei den Zelllinien 117HF, 118HF, FA und HFs auf. Alle Zelllinien reduzierten nach Bestrahlung mit 4 Gy ihre mitotische Aktivität auf 0,17-0,28. Nur die Zellen des Ataxia teleangiectasia-Patienten verhielten sich deutlich anders. Sie teilten sich zwar auch seltener, es wurden aber immer noch der Faktor 0,69 der ursprünglichen Mitoserate erreicht.

Bei den Karzinomzelllinien veränderte sich die Mitoserate mit zunehmender Bestrahlungsdosis nur geringfügig. Im Falle der Zellen des Glioblastoms verringerte sie sich nach 4 Gy Bestrahlung auf 0,92, bei der Zelllinie CHOR auf 0,79. Beim malignen Melanom blieb die Mitoserate nahezu unverändert.

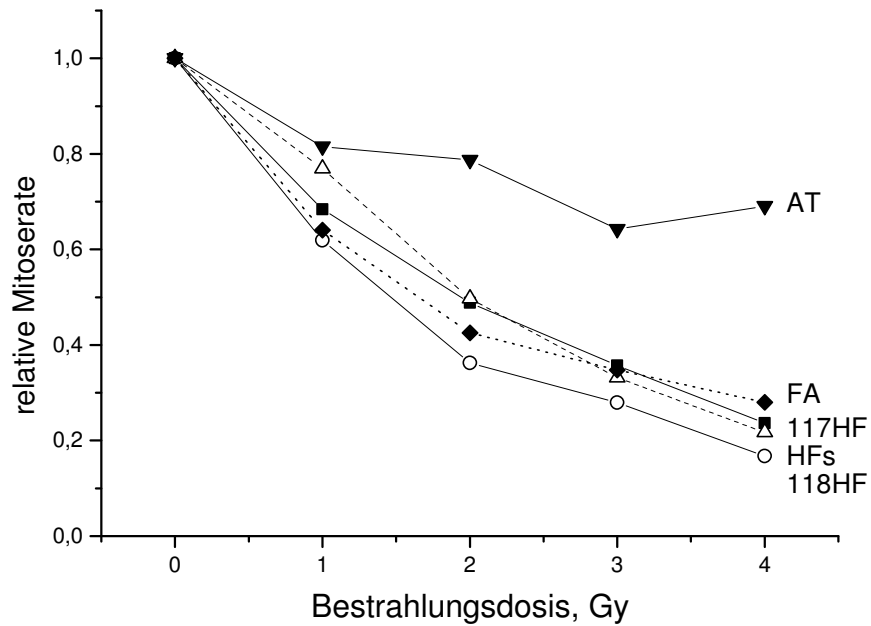


Abbildung 3.11: Relative Mitoserate der Fibroblastenzelllinien 117HF, 118HF, HFs, FA und AT im Mikrokern-Assay 48 Stunden nach Bestrahlung.

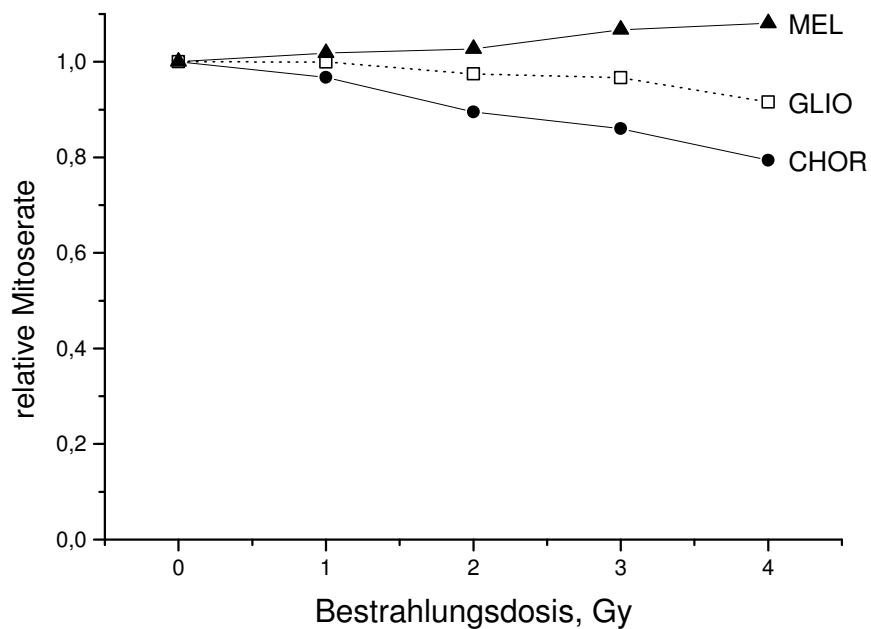


Abbildung 3.12: Relative Mitoserate der Tumorzelllinien CHOR, GLIO und MEL 24 Stunden nach der Bestrahlung.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass alle Fibroblasten auf Bestrahlung mit einer deutlichen Abnahme der Mitoserate reagierten. Bei der Zelllinie AT fiel die Abnahme der Mitoserate jedoch wesentlich geringer aus als bei den anderen Fibroblasten. Die Tumorzelllinien teilten sich auch nach Bestrahlung mit 1-4 Gy noch fast so häufig, wie unbestrahlte Zellen.

Tabelle 3.6: Relative Mitoserate der Zelllinien im Mikrokern-Assay nach Bestrahlung mit 1 bis 4 Gy. Die bei entsprechender Bestrahlungsdosis noch erreichten Teilungsraten wurden durch die Mitoserate unbestrahlter Zellen dividiert.

117HF	0 Gy	1 Gy	2 Gy	3 Gy	4 Gy
48 Stunden nach Bestrahlung					
117HF	1,00	0,68	0,49	0,36	0,24
118HF	1,00	0,62	0,36	0,28	0,17
HF _s	1,00	0,77	0,50	0,33	0,22
FA	1,00	0,64	0,43	0,35	0,28
AT	1,00	0,82	0,79	0,64	0,69
24 Stunden nach Bestrahlung					
CHOR	1,00	0,97	0,89	0,86	0,79
GLIO	1,00	1,10	0,97	0,97	0,92
MEL	1,00	1,02	1,03	1,07	1,08

3.3 Induktion und Reparatur von bestrahlungsinduzierten DNS-Schäden im Comet-Assay

3.3.1 Typische Gestalt der Kometen

Die acht Zelllinien zeigten in allen gemessenen Parametern (TM_{IT} , TM_R , TM_0 , $t_{0.5}$) deutliche Unterschiede. Ein schon auf fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erkennbarer Unterschied ergibt sich bei den Zellen des Chorionkarzinoms und des Glioblastoms (Abbildung 3.13). So waren bei den Zellen des Chorionkarzinoms direkt nach Bestrahlung ausgeprägte Kometenschweife mit intensiver Fluoreszenz sichtbar. Auch nach 5 Minuten langer Reparaturzeit im Brutschrank waren noch deutliche Kometen zu erkennen. Im Vergleich dazu zeigte die Zelllinie des Glioblastoms direkt nach der Bestrahlung ein deutlich geringeres initiales TM. Nach einer Reparaturzeit von 5 Minuten konnte bei den Zellen kein Schweif mehr erkannt werden. Das TM war fast schon auf den Kontrollwert abgesunken.

Die exakte Bestimmung des TM zu jedem Messzeitpunkt wurde mit Hilfe einer Software zur Bildanalyse durchgeführt.

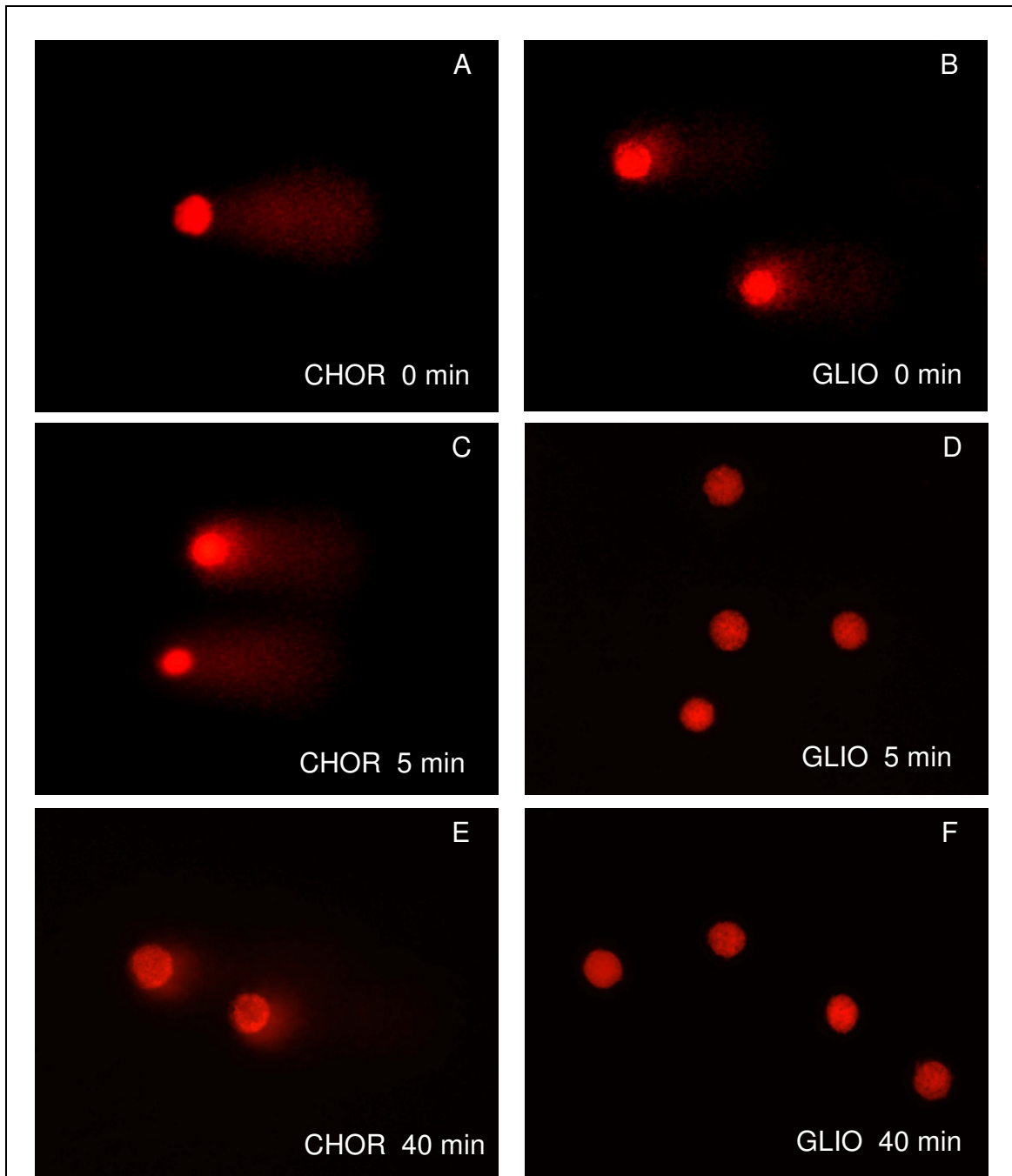


Abbildung 3.13: DNS-Schäden und -Reparatur der Zellen des Chorionkarzinoms (links) und des Glioblastoms (rechts) untersucht mittels alkalischem Comet-Assay. Die Zellen wurden mit 5 Gy bestrahlt und die DNS-Reparatur sofort (A, B), nach 5 Minuten (C, D) bzw. nach 40 Minuten (E, F) gestoppt. Im Anschluss an die Lyse und Elektrophorese wurden die Kometen mit Propidiumjodid angefärbt.

3.3.2 Reparaturverlauf der Zellen im Comet-Assay

Als Beispiel für alle Zelllinien werden zunächst die Reparaturkurven der zwei Einzelversuche der Zelllinie FA dargestellt (Abbildung 3.14). Ebenso wurde bei der Auswertung mit allen Zelllinien vorgegangen.

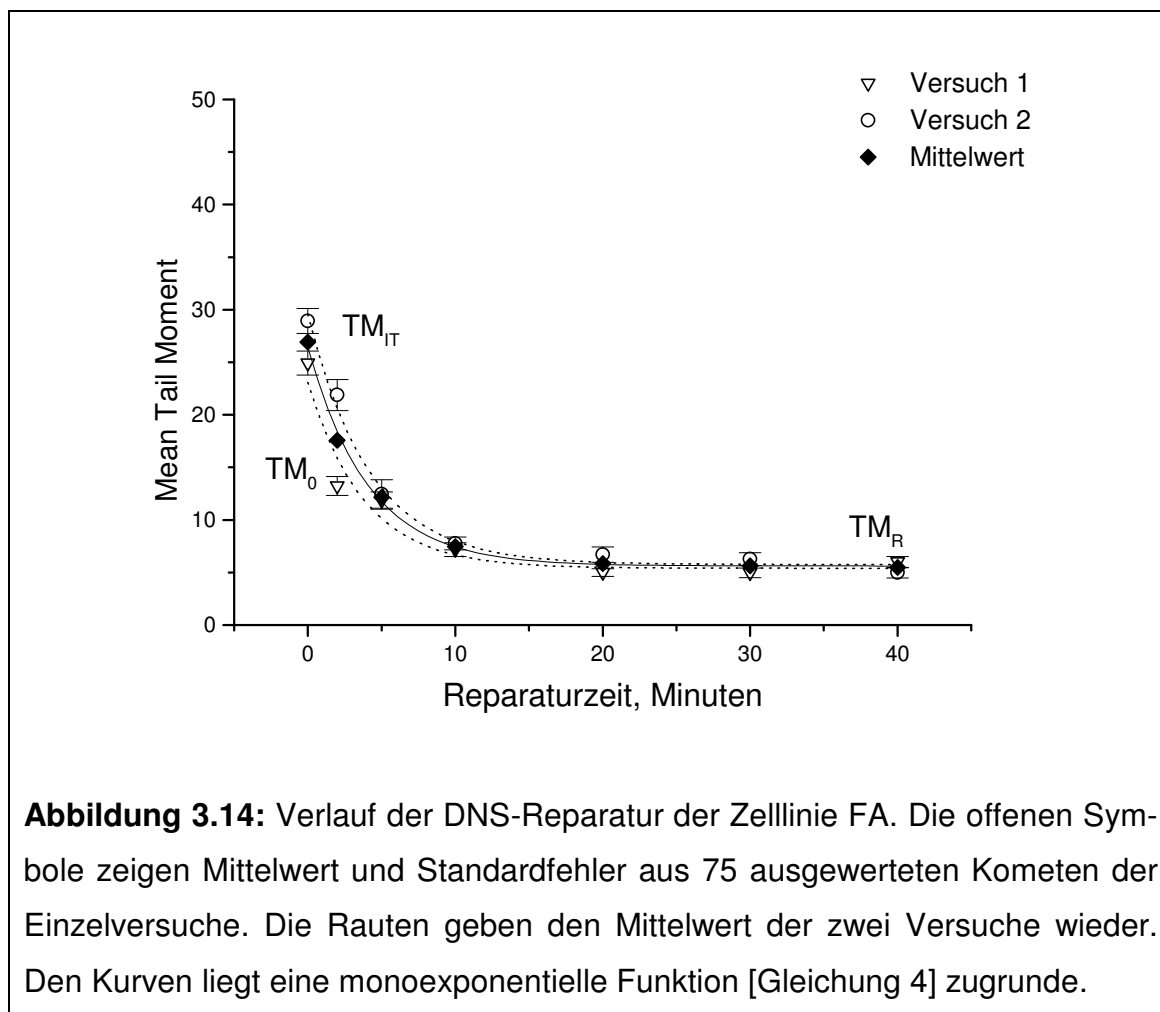


Abbildung 3.14: Verlauf der DNS-Reparatur der Zelllinie FA. Die offenen Symbole zeigen Mittelwert und Standardfehler aus 75 ausgewerteten Kometen der Einzelversuche. Die Rauten geben den Mittelwert der zwei Versuche wieder. Den Kurven liegt eine monoexponentielle Funktion [Gleichung 4] zugrunde.

Das initiale Tail Moment (TM_{IT}), das residuale Tail Moment (TM_R), der von den Zellen reparierte Schaden (TM_0) und die Reparaturhalbwertszeit ($t_{0.5}$) wurden jeweils aus den Kurven errechnet. Für die Zelllinie des Fanconi-Anämie-Patienten, ergab sich ein initiales TM von 26,4. Den Zellen war es möglich, einen DNS-Schaden von 20,8 zu reparieren, so dass ein residuales TM von 5,6 erhalten blieb. Die Reparaturhalbwertszeit betrug 2,8 Minuten.

Tabelle 3.7 zeigt das initiale TM (TM_{IT}), den reparablen DNS-Schaden (TM_0) und den nach 40 Minuten noch bestehenden residualen Schaden (TM_R) aller verwendeten Zelllinien. Die Zeit, bis zu der noch 50% des initialen DNS-Schadens vorhanden ist, wird durch den Parameter $t_{0,5}$ wiedergegeben.

Tabelle 3.7: Induktion und Reparatur des DNS-Schadens der Zelllinien im Comet-Assay.

	TM_{IT}	TM_0	TM_R	$t_{0,5}$ (Min)
117HF	22,0	18,0	4,0	13,6
118HF	19,6	15,0	4,5	7,5
HF _s	25,8	21,6	4,2	4,8
FA	26,4	20,8	5,6	2,8
AT	21,5	12,5	9,0	17,0
CHOR	44,0	34,7	9,4	4,0
GLIO	25,2	21,3	4,0	1,1
MEL	22,7	17,5	5,2	6,2

Die folgenden Abbildungen zeigen den Reparaturverlauf jeder Zelllinie. Um einen besseren Vergleich der Zelllinien untereinander zu ermöglichen, wurde die Kurve der schon vorgestellten Zelllinie FA (Abbildung 3.14) in jedes Diagramm mit eingezeichnet.

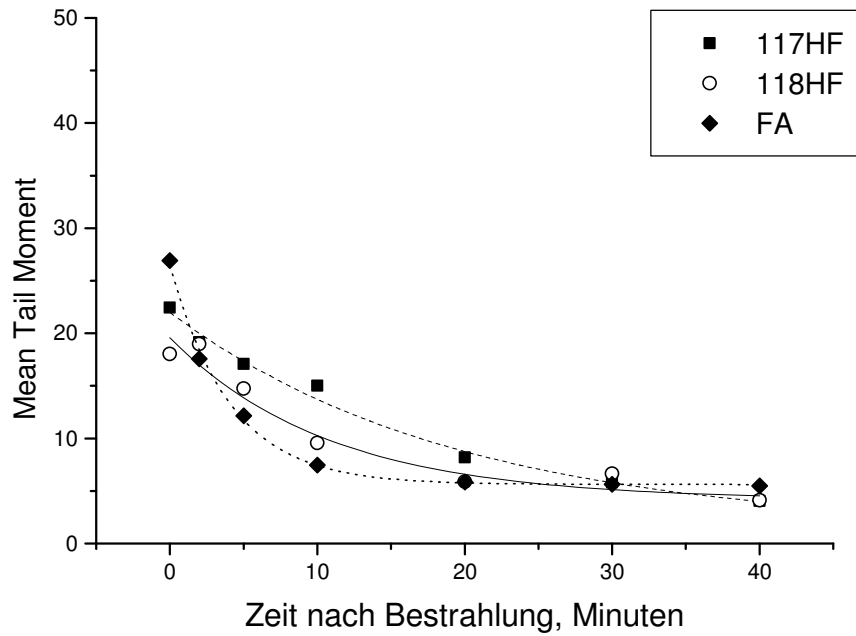


Abbildung 3.15: DNS-Schaden und -Reparaturkinetik der Zelllinien 117HF, 118HF und FA im Comet-Assay nach Bestrahlung mit 5 Gy.

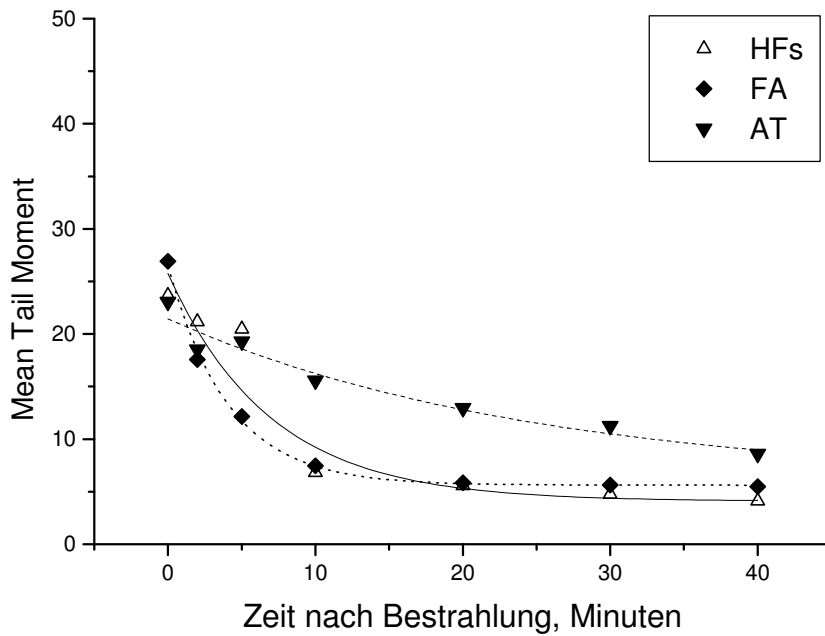


Abbildung 3.16: DNS-Schaden und -Reparaturkinetik der Zellen der Patienten mit AT, dem AT-ähnlichen Syndrom (HFAs) und der FA im Comet-Assay.

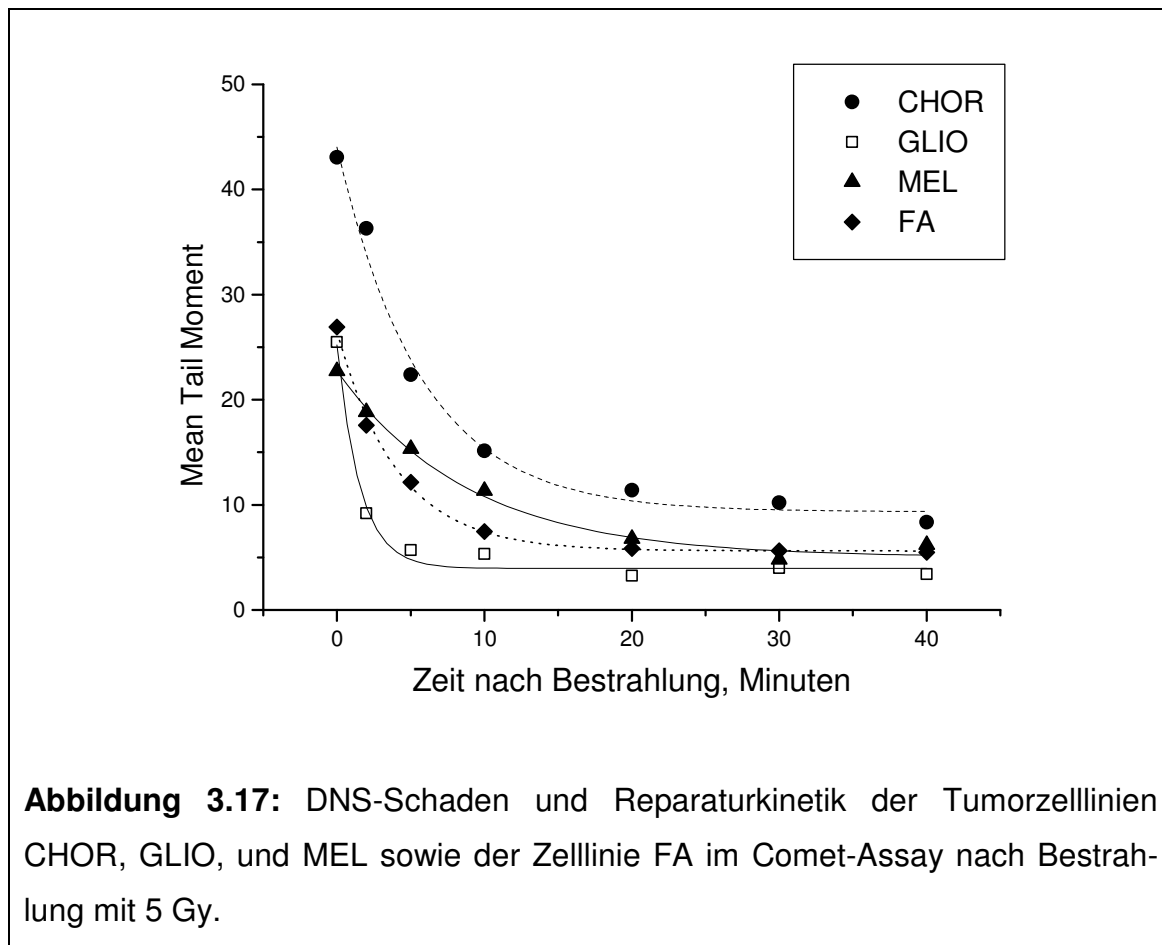


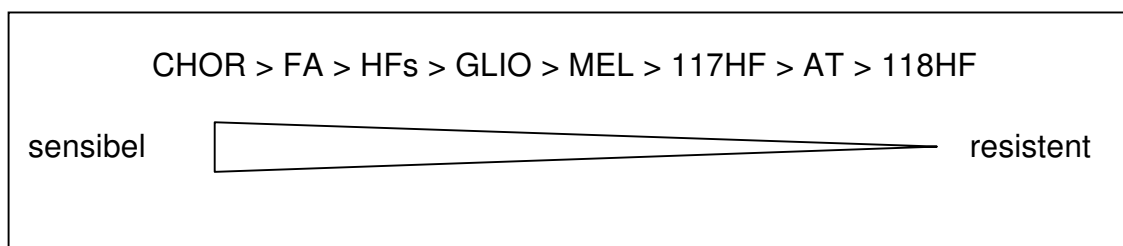
Abbildung 3.15 zeigt die Reparaturkinetik der Zelllinien 117HF und 118HF. Zusätzlich ist die Kurve der Zelllinie FA eingezeichnet, die oben schon ausführlich beschrieben wurde. Das initiale TM lag bei den Fibroblasten 117HF und 118HF niedriger als bei der Zelllinie FA. Auffällig ist auch die längere Reparaturzeit der erstgenannten Zelllinien. Nach 40 Minuten lag das residuale TM aller drei Zelllinien dicht zusammen.

Der Reparaturverlauf der Zelllinien der Patienten mit den genetisch bedingten Syndromen (AT, AT-ähnlich, FA) ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Hier lag das initiale TM aller Zelllinien relativ dicht zusammen. Deutlich zu erkennen ist der sehr langsame Verlauf der DNS-Reparatur bei den AT-Zellen. Ihre Reparaturhalbwertszeit lag bei 17 Minuten und war damit die langsamste aller hier getesteten Zelllinien. Zusätzlich zeigten die AT-Zellen nach einer Reparaturzeit von 40 Minuten einen hohen residualen DNS-Schaden. Der Reparaturverlauf

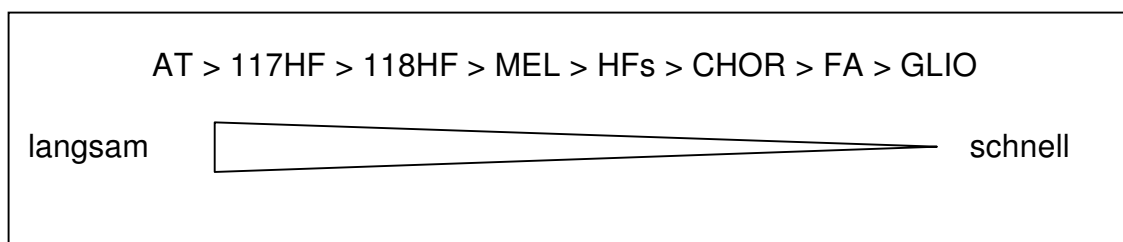
der Zelllinie des Fanconi-Anämie-Patienten, sowie der Zellen des Patienten mit dem AT-ähnlichen Syndrom war annähernd gleich.

In Abbildung 3.17 ist die Reparaturkinetik der drei Tumorzelllinien dargestellt. Hier verlief die Reparatur sehr unterschiedlich. Der initiale DNS-Schaden der Chorionkarzinomzellen lag mit 44,0 wesentlich höher als bei allen anderen Zelllinien. Die Zellen waren jedoch in relativ kurzer Zeit ($t_{0,5}=4,0$ Min) in der Lage, einen Großteil des Schadens zu reparieren. Dennoch lag das residuale TM nach 40 Minuten noch etwa so hoch wie bei den AT-Zellen. Die Zellen des Melanoms wiesen ein niedrigeres initiales TM auf, als die Vergleichzelllinie FA. Die Reparatur verlief aber von allen Karzinomzellen am langsamsten ($t_{0,5}=6,2$ Minuten). Dennoch war das residuale TM etwa so niedrig, wie bei den FA-Zellen. Das Glioblastom besaß die kürzeste Reparaturzeit aller getesteten Zellen. Mit einer Reparaturhalbwertszeit von nur 1,1 Minuten war diese Zelllinie in der Lage, den anfänglich mit der Zelllinie FA vergleichbaren Schaden auf den niedrigsten Restschaden überhaupt zu senken.

Geordnet nach der Größe des initialen DNS-Schadens ergibt sich folgende Reihenfolge der „Strahlensensibilität“ beginnend mit der sensibelsten Zelllinie:

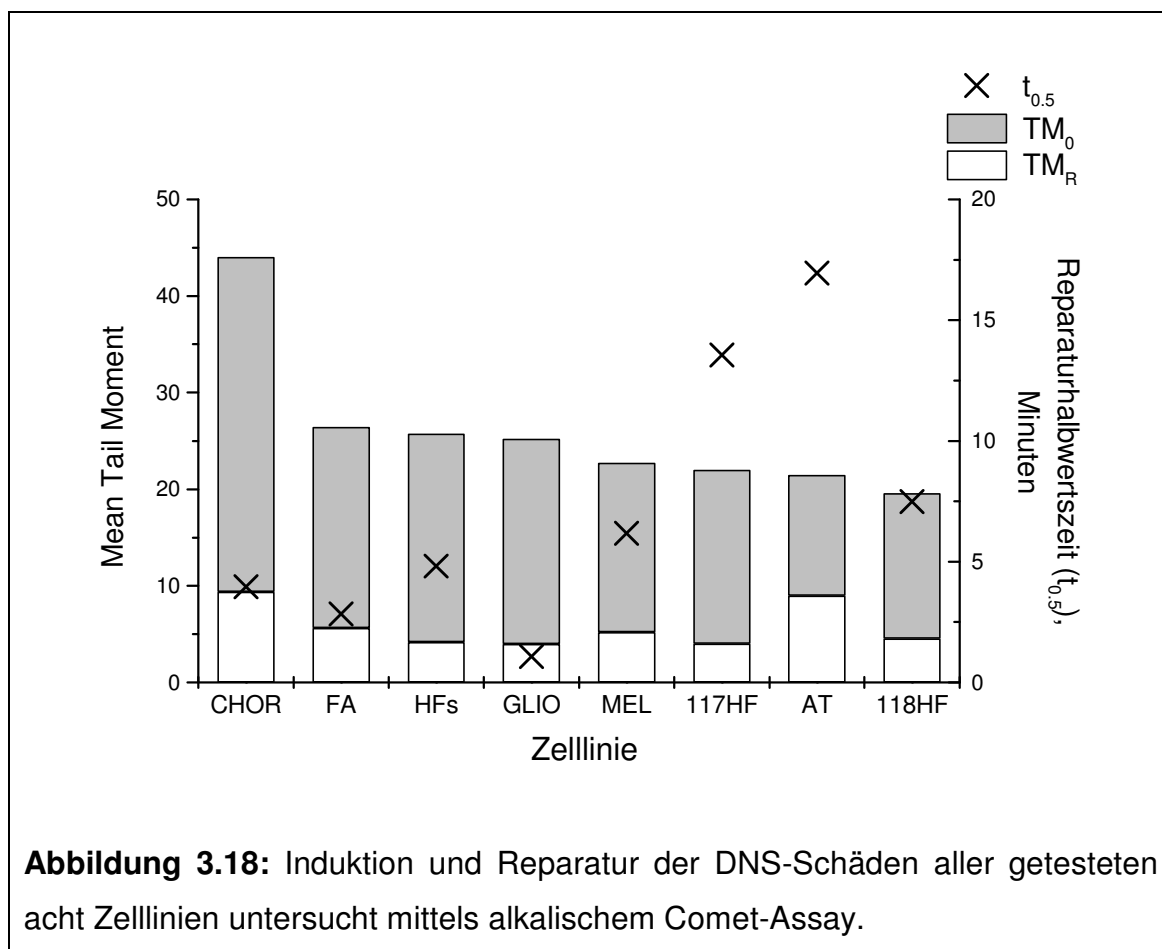


Nach der Geschwindigkeit der DNS-Reparatur geordnet ergibt sich eine andere Reihenfolge. Die folgende Aufzählung beginnt mit der langsamsten Reparaturzeit:



3.3.3 Direkter Vergleich der Parameter TM_{IT} , TM_0 , TM_R und $t_{0.5}$ aller Zelllinien

Um einen direkten Vergleich aller Zelllinien zu ermöglichen sind die Parameter TM_0 und TM_R , welche addiert den Parameter TM_{IT} ergeben, und die Reparaturhalbwertszeit $t_{0.5}$ in einem Balkendiagramm dargestellt.



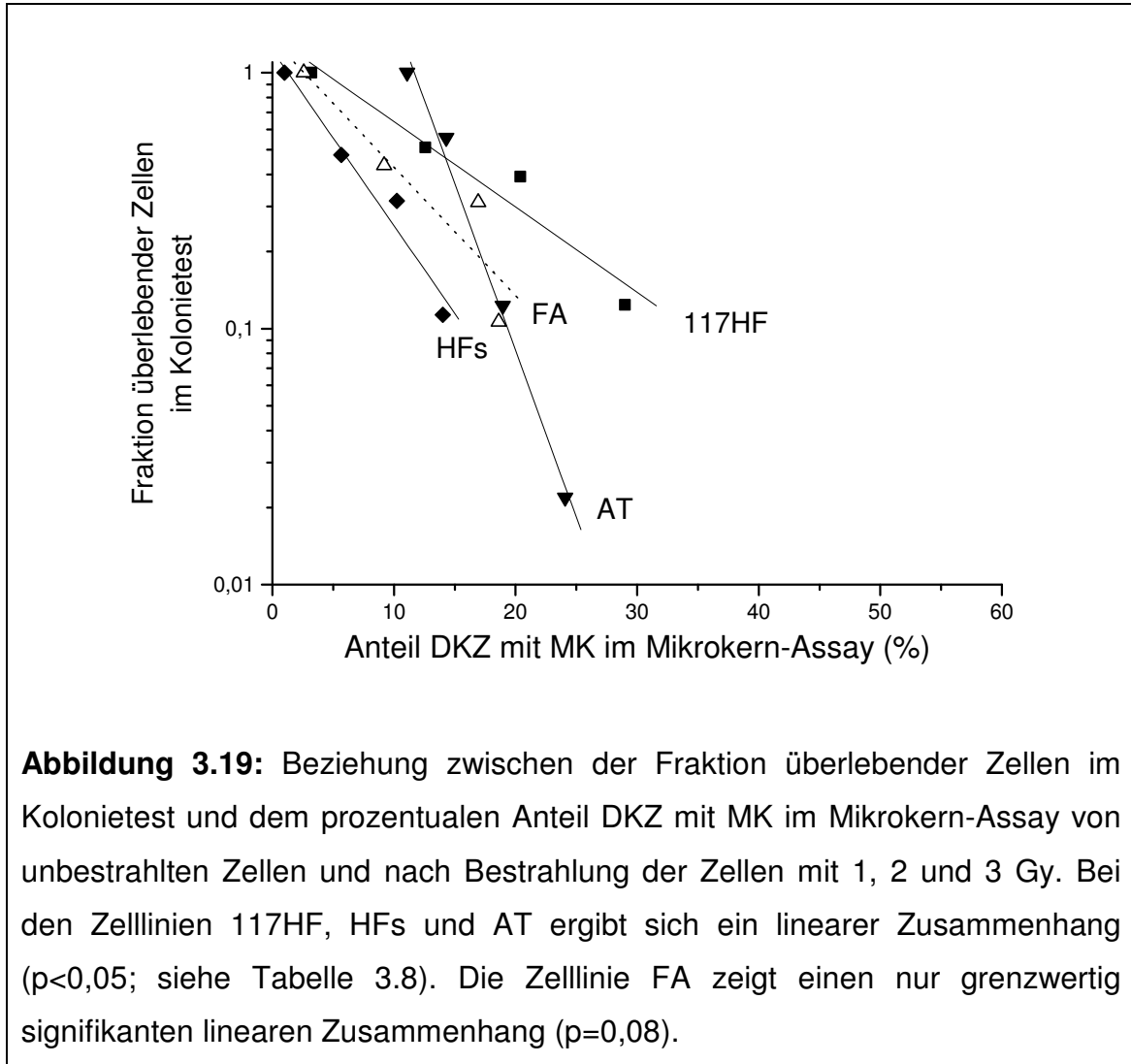
Zu erkennen ist wie oben beschrieben das hohe initiale TM der Zelllinie CHOR. Ebenfalls auffällig ist der erhöhte DNS-Restschaden bei den Zelllinien CHOR und AT. Bei der Zelllinie AT fällt zusätzlich der geringe reparierte Schaden TM_0 auf. Weiter ist die sehr langsame Reparatur der AT-Zellen, besonders im Vergleich mit dem Glioblastom zu erkennen.

3.4 Korrelationen zwischen Parametern des Kolonietests, des Mikrokern-Assays und des Comet-Assays

Der Kolonietest, der Mikrokern-Assay und der Comet-Assay werden in vielen Laboren genutzt, um die Strahlensensibilität verschiedenster Zellkulturen zu testen. Um die Frage zu klären, ob die Verfahren zu vergleichbaren Ergebnissen führen, wurde in dieser Arbeit versucht, Korrelationen zwischen den einzelnen Tests zu finden. Dazu wurden charakteristische Parameter jedes Testverfahrens ausgewählt und diese in einem Graphen gegeneinander aufgetragen. Wichtige mögliche Korrelationen werden im Folgenden dargestellt.

3.4.1 Korrelationen zwischen Kolonietest und Mikrokern-Assay

Sowohl im Kolonietest, als auch im Mikrokern-Assay wurden Zellen unter anderem mit 1, 2 und 3 Gy bestrahlt. Werden die bei der jeweiligen Dosis erhaltenen Ergebnisse beider Versuchsreihen einander gegenübergestellt, so ergeben sich lineare Regressionen (siehe Abbildung 3.19 und 3.20). Diese sind für die Zelllinien 117HF, 118HF, HFs, AT, GLIO und MEL mit $p < 0,05$ statistisch signifikant (siehe Tabelle 3.8). Bei der Zelllinie des Fanconi-Anämie-Patienten zeigte sich ein grenzwertig signifikanter Zusammenhang ($p=0,08$). Bei den Zellen des Chorionkarzinoms konnte keine signifikante lineare Regression nachgewiesen werden ($p=0,15$).



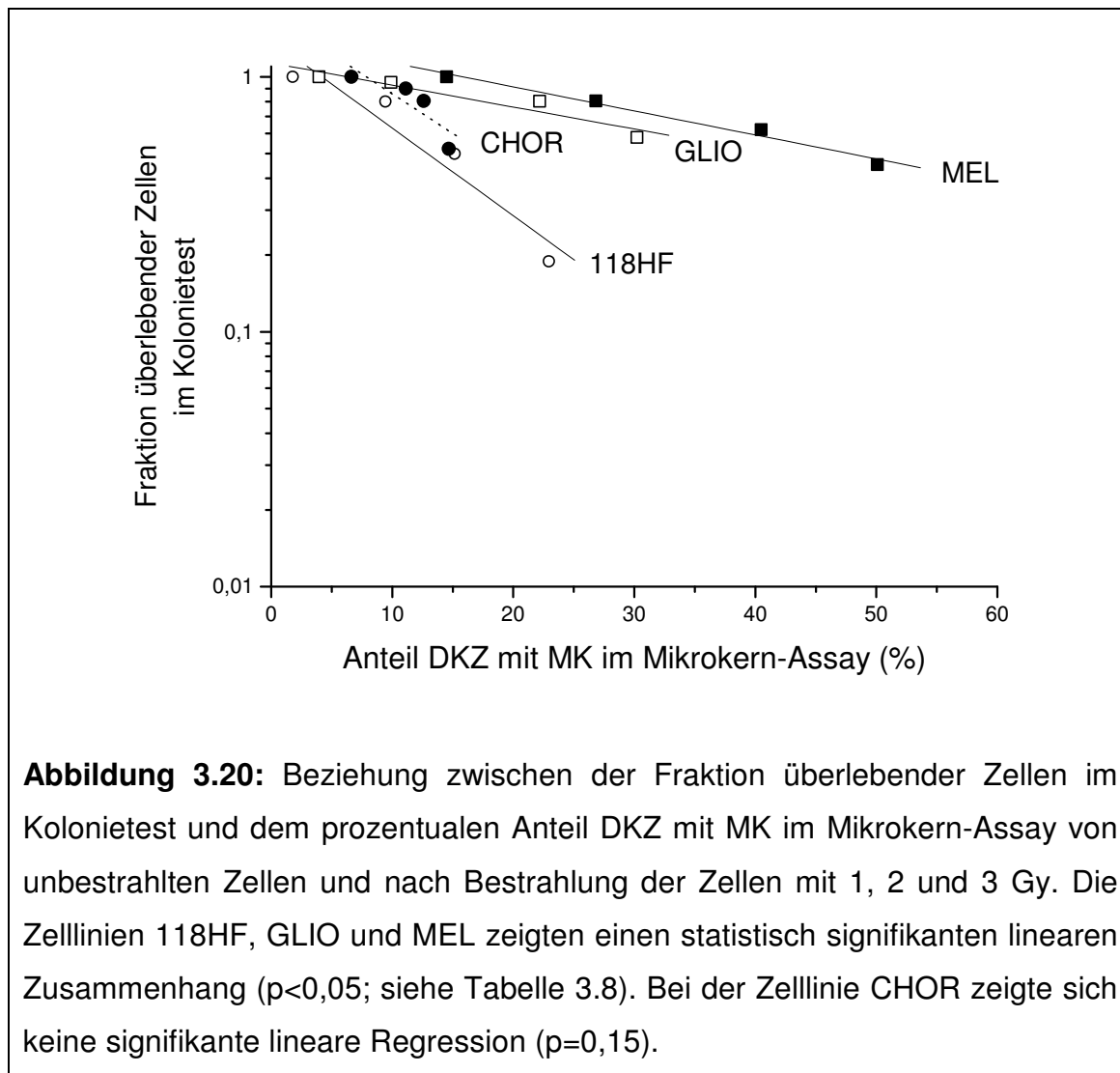


Tabelle 3.8: Lineare Regression zwischen der Fraktion überlebender Zellen im Kolonietest und dem prozentualen Anteil DKZ mit MK im Mikrokern-Assay nach Bestrahlung der Zellen mit 1, 2 und 3 Gy. **R** ist der Regressionskoeffizient, **SD** die Standardabweichung. Die Regression ist für die Zelllinien FA und CHOR nicht signifikant (mit * gekennzeichnet). Für alle anderen Zelllinien gilt: $p < 0,05$.

	R	SD	p
117HF	-0,97	0,11	0,030
18HF	-0,96	0,11	0,042
HFs	-0,98	0,10	0,020
FA	-0,92	0,19	0,080*
AT	-1,00	0,10	0,004
CHOR	-0,86	0,08	0,145*
GLIO	-0,95	0,04	0,048
MEL	-0,99	0,03	0,010

Bei einem Vergleich des Kolonietests und des Mikrokern-Assays innerhalb einer Zelllinie lässt sich also ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Testverfahren nachweisen.

Nun stellt sich die Frage, ob generell ein bestimmter Prozentsatz an Mikrokernen einer definierten Fraktion überlebender Zellen im Kolonietest entspricht, unabhängig von der Zelllinie. In Abbildung 3.21 wird der Parameter SF2 des Kolonietests dem Anteil DKZ mit MK nach Bestrahlung mit 2 Gy gegenübergestellt.

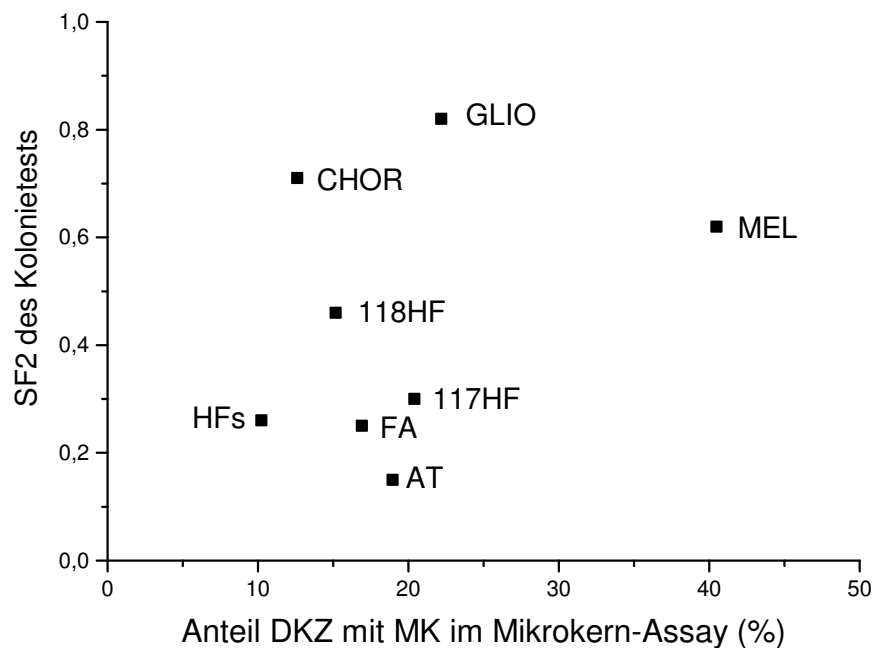


Abbildung 3.21: Beziehung zwischen dem prozentualen Anteil DKZ mit MK im Mikrokern-Assay und dem Parameter SF2 im Kolonietest nach Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy.

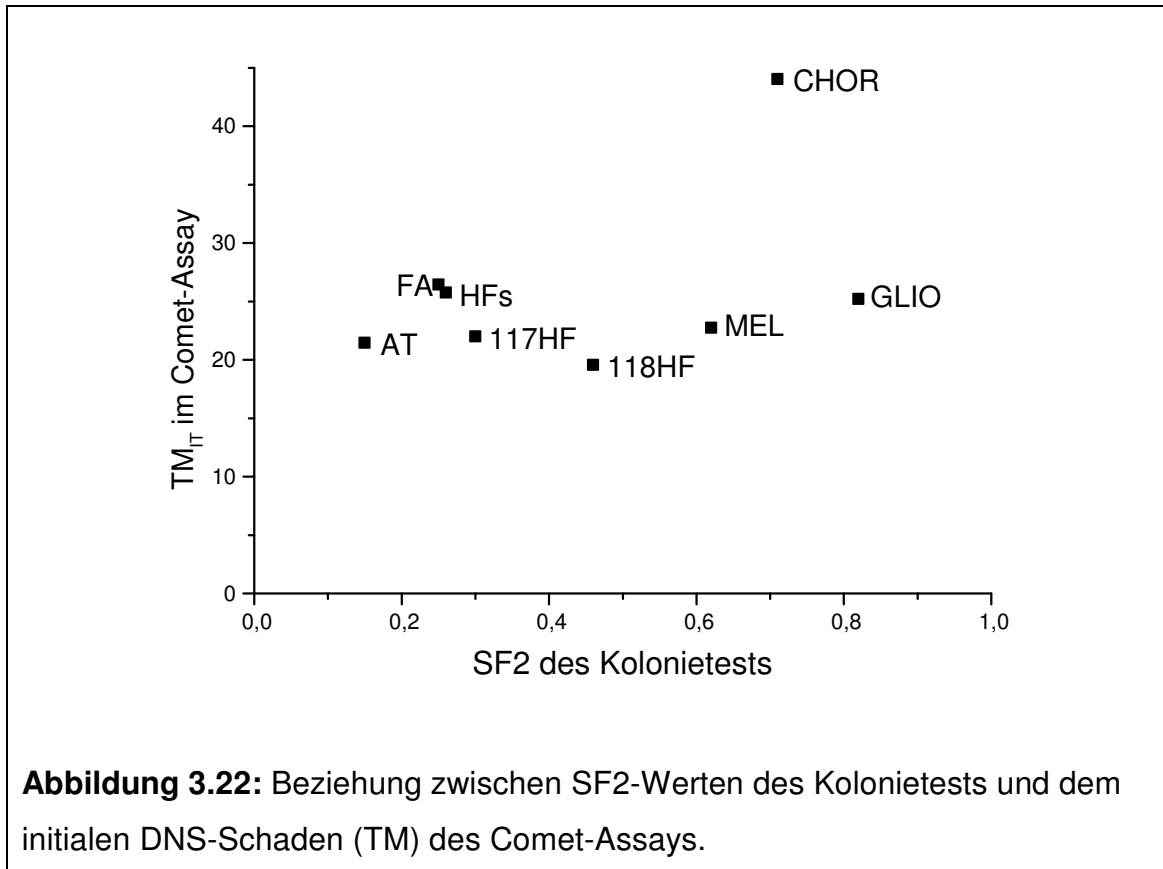
Es wird deutlich, dass keine Korrelation zwischen dem Parameter SF2 des Kolonietests und dem Anteil mikrokernhaltiger Zellen im Mikrokern-Assay nach Bestrahlung mit 2 Gy bei verschiedenen Zelllinien besteht.

Auch beim Vergleich anderer Parameter des Mikrokern-Assays - zum Beispiel dem prozentualen Anteil an DKZ mit MK nach Bestrahlung mit 4 Gy oder der Mitoserate - und dem SF2-Wert des Kolonietests konnten zwischen den verschiedenen Zelllinien keine Korrelationen gefunden werden.

Abschließend ist also festzuhalten, dass innerhalb einer Zelllinie ein Zusammenhang zwischen Parametern des Kolonietests und des Mikrokern-Assays vorhanden zu sein scheint. Beim Vergleich von Zelllinien unterschiedlicher Herkunft kann diese Korrelation aber nicht nachgewiesen werden.

3.4.2 Zusammenhänge zwischen Kolonietest und Comet-Assay

Im Folgenden wird zunächst das TM_{IT} des Comet-Assays gegen den SF2-Wert des Kolonietests aufgetragen.



Zwischen dem initialen TM des Comet-Assays und der Fraktion koloniebildender Zellen nach 2 Gy Bestrahlung (SF2) im Kolonietest besteht keine signifikante Korrelation.

Ebenso finden sich keine Korrelationen bei einem Vergleich von SF2-Werten des Kolonietests mit dem residualen TM oder dem von den Zellen reparierten Schaden (TM_0).

Eine signifikante negative Korrelation ($R=-0,99$; $p<0,001$) besteht jedoch zwischen der Reparaturhalbwertszeit $t_{0,5}$ und dem SF2-Wert bei Betrachtung der Zelllinien AT, 117HF, 118HF, GLIO, CHOR und MEL. Die Werte der Zellen der Patienten mit dem AT-ähnlichen Syndrom (HFs) und der Fanconi-Anämie (FA) können mit dieser Korrelation jedoch nicht vereinbart werden (Abbildung 3.23).

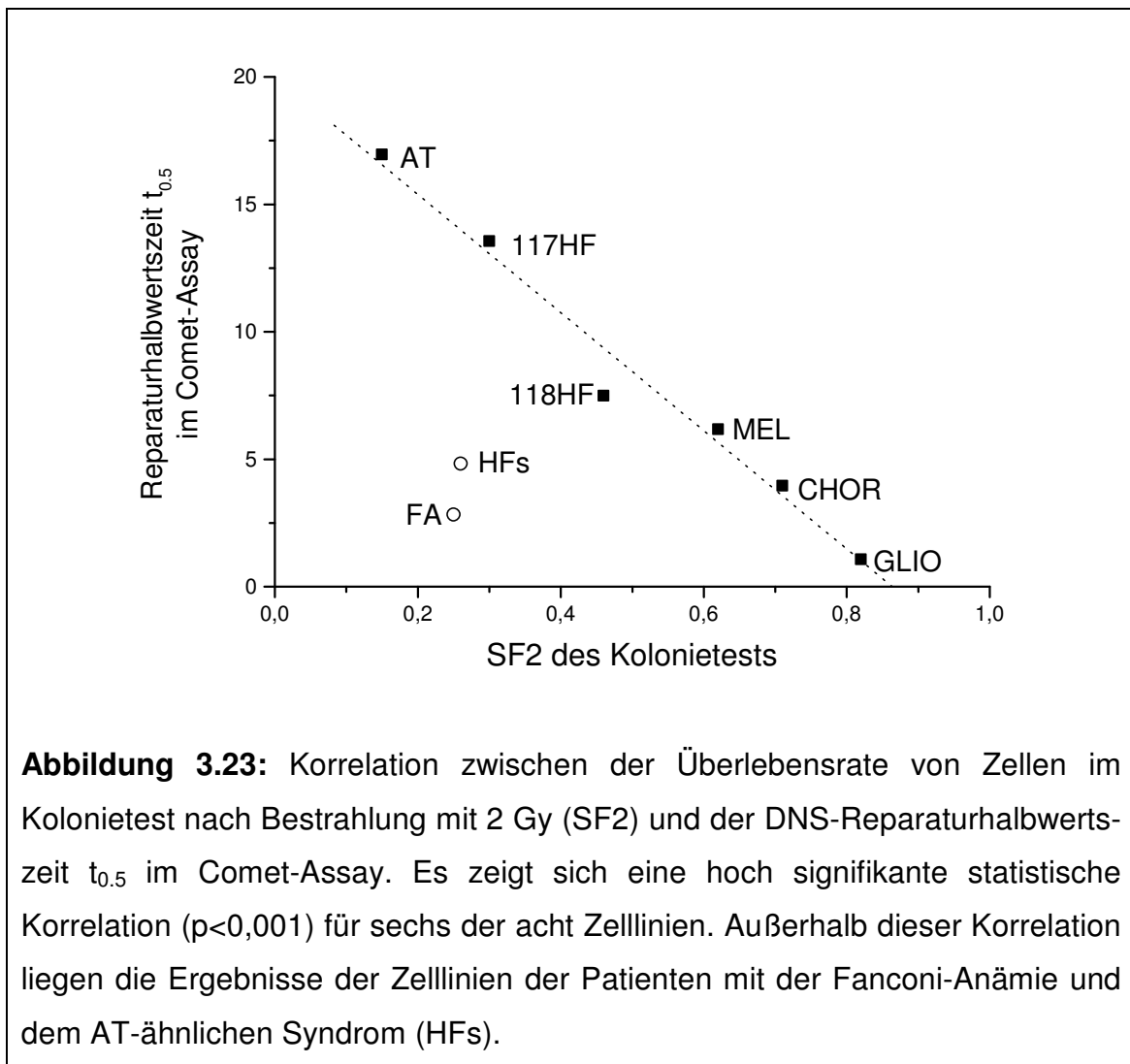
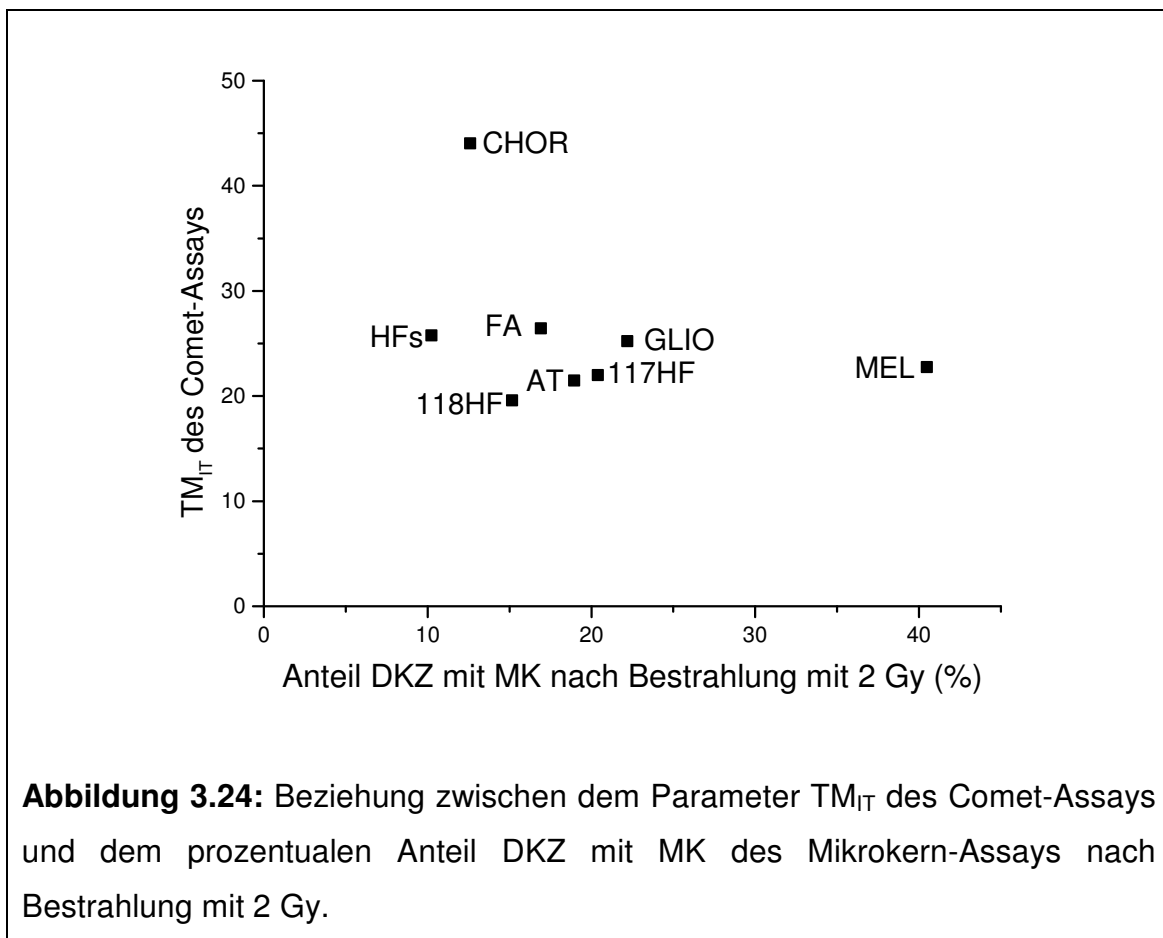


Abbildung 3.23: Korrelation zwischen der Überlebensrate von Zellen im Kolonietest nach Bestrahlung mit 2 Gy (SF2) und der DNS-Reparaturhalbwertszeit $t_{0,5}$ im Comet-Assay. Es zeigt sich eine hoch signifikante statistische Korrelation ($p<0,001$) für sechs der acht Zelllinien. Außerhalb dieser Korrelation liegen die Ergebnisse der Zelllinien der Patienten mit der Fanconi-Anämie und dem AT-ähnlichen Syndrom (HFs).

3.4.3 Korrelationen zwischen Mikrokernen und Comet-Assay

Zwischen dem initialen DNS-Schaden (TM) gemessen im Comet-Assay und dem Anteil mikrokernhaltiger Zellen nach Bestrahlung mit einer Dosis von 2 Gy im Mikrokern-Assay besteht keine Korrelation (Abbildung 3.24). Ebenso existiert keine Korrelation zwischen anderen Parametern des Comet-Assays (TM_0 , TM_R , $t_{0.5}$) und denen des Mikrokern-Assays nach Bestrahlung mit verschiedenen Röntgendosen.



4 Diskussion

4.1 Vorbemerkungen

Die Suche nach einem prädiktiven Test, der in der Lage ist, zuverlässig die Strahlenempfindlichkeit von Tumor- oder Normalgeweben vorherzusagen, wurde lange als Suche nach dem „heiligen Gral“ der Strahlenbiologie bezeichnet [Peters et al., 1990]. Mit solch einem Test könnte die individuelle Strahlentherapie und damit auch das Therapieergebnis für den Patienten erheblich verbessert werden. Dies würde letztlich zu einem längeren Überleben der Patienten und einer Vermeidung von unerwünschten Nebenwirkungen der Bestrahlung führen. Lange Zeit war solch ein Test aber nicht in Sicht.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit drei etablierten Testmethoden zur Erkennung von Strahlenschäden an Zellkulturen *in vitro*. Der Kolonietest, der Mikrokern-Assay und der Comet-Assay wurden mit acht Zelllinien aus den verschiedensten Ursprungsgeweben durchgeführt. Anschließend wurde nach Zusammenhängen zwischen den Testverfahren gesucht. Trotz der relativ kleinen Anzahl und der großen Heterogenität der Zelllinien wurde eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem SF2-Wert im Kolonietest und der Reparaturhalbwertszeit im Comet-Assay für sechs der acht getesteten Zelllinien gefunden. Auch in anderen neueren Studien werden ähnliche Korrelationen beschrieben [McKelvey-Martin et al., 1998; Brammer et al., 2001; Dunne et al., 2003; McKeown et al., 2003; Moneef et al., 2003]. Dies gibt Anlass zur Hoffnung, dass der Comet-Assay sich tatsächlich als prädiktiver Test in der Klinik bewähren könnte. Bis dahin sind jedoch noch viele weitere Studien notwendig.

Mögliche Erklärungen für bestehende oder fehlende Korrelationen zwischen dem Kolonietest, dem Mikrokern-Assay und dem Comet-Assay werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.2 Der Kolonietest als Standard prädiktiver Testverfahren

Der Kolonietest ist der älteste prädiktive Test zur Untersuchung der Strahlensensibilität von Zelllinien in vitro. Er wird schon seit nahezu 50 Jahren angewandt. Obwohl er extrem zeitaufwendig (Inkubationszeiten von 2-3 Wochen) und mit einigen Zelllinien nicht durchführbar ist, gilt er immer noch als Standardtest zur Prüfung der Strahlensensibilität in vitro [Pomp et al., 1996]. Ein wesentlicher Vorteil des Kolonietests ist, dass er alle Arten des Zelltodes misst und somit einen Globaltest für die Auswirkung von Strahlenschäden darstellt (siehe Abbildung 1.1). Eine klinische Anwendung dieses Testverfahrens ist aber aufgrund der langen Inkubationszeiten nicht praktikabel. Wegen seiner großen Verlässlichkeit wird der Kolonietest in der Forschung oft als Referenztest für neuere Testmethoden verwendet. Finden sich Korrelationen zwischen dem neuen Test und dem Kolonietest, wird dies als Hinweis darauf gewertet, dass mit dem neuen Testverfahren die klinische Strahlenempfindlichkeit von Zellen wiedergegeben werden kann. Nicht zu vergessen ist dabei aber, dass auch beim Kolonietest letztendlich noch nicht sicher ist, inwieweit er in der Lage ist, die klinische Radiosensibilität von Patienten widerzuspiegeln (siehe Abschnitt 1.3).

Auch in dieser Arbeit ordnete der Kolonietest die Zelllinien in der Reihenfolge an, die man klinisch erwarten würde: Die Zellen der Patienten mit den Syndromen Ataxia teleangiectasia und Fanconi-Anämie reagierten am sensibelsten. Es folgten die Zelllinie des Patienten mit dem AT-ähnlichen Syndrom und dann die Zelllinien der nach Bestrahlung normal reagierenden Patienten. Am resistentesten erschienen die drei Tumoren - das maligne Melanom, das Chorionkarzinom und das Glioblastom.

Bei der Auswertung des Kolonietests wurde das linear-quadratische Modell [Gleichung 1] verwendet (siehe Abschnitt 2.3.2). Chapman et al. (2003) fanden durch Untersuchung von Tumorzellen heraus, dass der α -Koeffizient des LQ-Modells mit der Kompaktheit der DNS im Zellkern korreliert. Zusätzlich konnte

gezeigt werden, dass Zellen mit besonders dicht gepacktem Chromatin eine erhöhte Strahlensensibilität aufweisen [Chapman et al., 2001]. Kompaktes, also stark kondensiertes Chromatin liegt in den Zellen besonders während der Mitosephase und in der Interphase bei radiosensiblen Zellen vor.

In dieser Arbeit lagen die α -Koeffizienten der Tumorzelllinien CHOR, GLIO und MEL mit 0-0,14/Gy am niedrigsten. Im Gegensatz dazu zeigten sich die höchsten α -Koeffizienten bei den relativ strahlenempfindlichen Zellen des Patienten mit der Fanconi-Anämie und bei dem Patienten mit dem AT-ähnlichen Syndrom (HFs) (siehe Tabelle 3.1). Dies kann bedeuten, dass bei diesen beiden Zelllinien eine hohe DNS-Kompaktheit mit die Ursache für die relativ hohe Radiosensibilität darstellt. Erstaunlicherweise liegt der α -Koeffizient bei der in dieser Arbeit am strahlensensibelsten Zelllinie, den AT-Zellen, bei nur 0,31. Die Mutation des ATM-Proteins der hier getesteten AT-Zelllinie scheint somit keine verstärkte DNS-Kondensation zu verursachen und die hohe Strahlensensibilität der Zellen eine andere Ursache zu haben.

4.3 Korrelationen zwischen Kolonietest und Mikrokern-Assay

Für alle acht Zelllinien konnte ein signifikanter, linearer Zusammenhang zwischen Bestrahlungsdosis und Mikrokernrate nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3.3; Abbildung 3.8 und 3.9).

Beim Vergleich der Ergebnisse des Kolonietests mit dem Mikrokern-Assay fällt aber auf, dass die acht Zelllinien in beiden Testverfahren nicht in der gleichen Reihenfolge im Hinblick auf die „Strahlensensibilität“ angeordnet werden. Während im Kolonietest durch den Parameter SF2 die Zelllinie AT am sensibelsten und die Zelllinie des Glioblastoms am resistentesten erscheint (siehe Abschnitt 3.1.3), finden sich im Mikrokern-Assay bei der Zelllinie des Patienten mit dem AT-ähnlichen Syndrom am wenigsten Mikrokern und bei dem malignen Melanom der höchste Prozentsatz an Mikrokernen nach Bestrahlung mit 2 Gy (siehe Abschnitt 3.2.3). Ähnliche Ergebnisse erhielten Bush et al. (1993) und Villa et al. (1994) beim Vergleich dieser beiden Testverfahren.

Interessanterweise ergeben sich bei der Suche nach Korrelationen zwischen dem Kolonietest und dem Mikrokern-Assay die in Abschnitt 3.4.1 dargestellten Ergebnisse:

- Werden die im Kolonietest und Mikrokern-Assay erhaltenen Werte innerhalb einer *einzelnen* Zelllinie nach Bestrahlung der Zellen mit jeweils 1, 2 und 3 Gy gegeneinander aufgetragen, so ergibt sich bei sechs von acht Zelllinien eine statistisch signifikante Korrelation (Tabelle 3.8, Abbildung 3.19 und 3.20) zwischen der Fraktion überlebender Zellen und dem Prozentsatz an Mikrokernen.
- Bei Betrachtung der Ergebnisse einer Bestrahlungsdosis beider Testverfahren zeigt sich zwischen *verschiedenen* Zelllinien aber keine Korrelation (Abbildung 3.21). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen O'Driscoll et al. (1998) und Akudugu et al. (2000).

Auch Wandl et al. (1989) und Villa et al. (1994) konnten Korrelationen zwischen dem Kolonietest und dem Mikrokern-Assay innerhalb einzelner Zelllinien durch ihre Versuche mit Nierenzellkarzinomen bzw. Melanom- und Ovarialtumorzellen nachweisen, nicht aber zwischen verschiedenen Zelllinien. Das deutet darauf hin, dass es eine unterschiedlich starke Neigung jeder getesteten Zelllinie gibt, Mikrokerne zu bilden, die aber dosisabhängig mit einer bestimmten Fraktion überlebender Zellen im Kolonietest korreliert. Nun stellt sich die Frage, ob diese für jede Zelllinie individuell unterschiedliche Mikrokernbildung durch die Heterogenität der hier getesteten Zelllinien bedingt ist. Wandl et al. (1989) kamen jedoch zum gleichen Ergebnis, obwohl sie eine homogene Gruppe von zehn Nierenkarzinomzelllinien testeten. Den Ursachen für diesen Sachverhalt muss in Zukunft weiter nachgegangen werden.

Wie groß die Variabilität der Mikrokernbildung auch bei einheitlichen Zelllinien sein kann, wird anhand der Zelllinie des malignen Melanoms deutlich. Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie zeigte sowohl spontan als auch nach Bestrahlung die höchste Mikrokernrate. Dies ist, nimmt man eine Korrelation von Strahlenempfindlichkeit im Kolonietest und Mikrokernbildung an, überra-

schend, da sie im Kolonietest mit einer SF2 von 0,62 recht strahlenresistent erschien. Doch auch schon in früher durchgeführten Studien von Villa et al. (1994) und Champion et al. (1995) konnte ein sehr hoher Prozentsatz an Mikrokernen bei verschiedenen Melanomzelllinien nachgewiesen werden. 1997 führten Widel et al. eine Versuchsreihe mit 25 Melanomzelllinien durch und fanden große Schwankungsbreiten bei der Induktion von Mikrokernen zwischen den verschiedenen Melanomen. Bei einer Zelllinie konnten sie sogar einen Unterschied zwischen dem Primärtumor und seiner Metastase nachweisen. Insgesamt scheint bei dieser Tumorart eine große Heterogenität für die Bildung von Mikrokernen vorzuliegen, ohne dass damit eine Aussage über die Strahlensensibilität der Tumoren getroffen werden kann.

Es gibt inzwischen einige Hypothesen, die zu erklären versuchen, warum verschiedene Zelllinien eine so unterschiedliche Neigung besitzen, Mikrokern zu bilden. Einige werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

Revell (1983) fand bei Untersuchungen mit synchronisierten Zelllinien heraus, dass in syrischen Hamster-Zellen jede Abweichung von einem reinen diploiden DNS-Gehalt des Zellkerns die Korrelation zwischen Mikrokern-Formation und Wachstumshemmung im Kolonietest aufhebt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten waren diploid, die Tumorzelllinien hingegen polyploid. Sie wiesen sogar von Zelle zu Zelle verschiedene Polyploidiegrade auf. Hier kann eine Ursache für die fehlende Korrelation zwischen dem Mikrokern-Assay und dem Kolonietest bei den getesteten Zelllinien liegen. Möglicherweise führt bei polyploiden Tumorzellen der Verlust von mehrfach vorhandenen Chromosomen durch Mikrokernbildung nicht automatisch zu einer Wachstumshemmung oder einem Tod der Zelle. Somit würde solch ein Chromosomenverlust nicht zu einer reduzierten Koloniezahl im Kolonietest führen, wohl aber zum Auftreten von Mikrokernen, was eine Korrelation zwischen beiden Testverfahren verhindern haben könnte. Abgesehen davon neigen Tumorzellen häufig zu atypischen Mitosen, welche nicht zu einem Wachstums-

stillstand der Zelle führen müssen, da die hierfür benötigten zellulären Regulationsmechanismen durch die maligne Entartung außer Kraft gesetzt sind.

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie mit der höchsten Polyploidie ist die Zelllinie des Chorionkarzinoms mit einem Chromosomensatz von $60-70 <3n>XXY$. Eine sich aus den oben beschriebenen Überlegungen ergebende Vermutung, dass Zellen mit einer größeren Anzahl „überschüssiger“ Chromosomen auch den höchsten Prozentsatz mikrokernhaltiger Zellen haben, ohne Auswirkung auf das Überleben im Kolonietest, kann anhand der hier erhobenen Daten nicht unterstützt werden.

Auch bei einer isolierten Betrachtung der rein diploiden Fibroblastenzellen ergab sich keine Korrelation zwischen dem Kolonietest und dem Mikrokern-Assay. Somit kann die Aneuploidie alleine nicht der Grund für die fehlende Korrelation beider Testverfahren sein.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die fehlende Korrelation zwischen Mikrokern-Assay und Kolonietest bei der Testung verschiedener Zelllinien liegt in der Beobachtung der Zellzyklusverteilung der einzelnen Zelllinien. Revell (1983) führte seine oben beschriebenen Versuche mit synchronisierten Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus durch. Wird in der G1-Phase von einem Ein-Chromatid-Chromosom ein Fragment durch eine einwirkende Noxe abgetrennt, so fehlt beiden nach der nächsten Mitose gebildeten Tochterzellen dieses genetische Material, was sich durch eine Wachstumshemmung der betroffenen Zellen bemerkbar machen kann. Hier wäre eine reduzierte Koloniezahl im Kolonietest zu erwarten. Wird jedoch erst nach der S-Phase ein Chromatidstrang beschädigt, so bleibt die genetische Information für eine der gebildeten Tochterzellen erhalten, da zum Zeitpunkt der Einwirkung der Noxe schon ein Zwei-Chromatid-Chromosom vorlag. In diesem Fall bliebe die Anzahl gebildeter Kolonien im Kolonietest unbeeinträchtigt. Auswirkungen einer Mikrokernbildung während der S-Phase sind im Einzelfall nicht absehbar [Bush et al., 1993].

In dieser Arbeit wurden keine synchronisierten Zellen verwendet und es lag somit eine Verteilung über sämtliche Zellzyklusphasen vor. In den Untersuchungen zur Mitoserate beim Mikrokern-Assay (Abschnitt 3.2.6) wurde die

unterschiedliche Dauer der Zellzyklen der verschiedenen Zelllinien deutlich. Unbestrahlt zeigten die Tumorzelllinien CHOR, GLIO und MEL nach 24 Stunden eine Mitoserate von 63-87%. Im Gegensatz dazu teilten sich die Fibroblasten nach 48 Stunden nur zu 21-36%, die Zelllinie HFs zu 60%. Da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Zellzyklus die G1-Phase ist, ist davon auszugehen, dass bei Bestrahlung unsynchronisierter Zelllinien sich langsam teilende Zellen öfter in der G1-Phase getroffen werden. Dadurch geht diesen Zellen häufiger ein Chromosomen-Fragment verloren, was zu der oben erläuterten Verminderung der Koloniebildung führen kann. In der Tat zeigte sich im Kolonietest, dass die SF2-Werte der sich langsam teilenden Fibroblasten durchweg geringer waren als die der sich schnell teilenden Tumorzellen.

Eine weitere mögliche Ursache für eine fehlende Korrelation von Kolonietest und Mikrokern-Assay wird bei Betrachtung der verschiedenen Zelltodmodi, dem mitotischen Zelltod und der Apoptose, klar (siehe Abschnitt 1.2). Die unbestrahlten Fibroblasten des Ataxia teleangiektasia-Patienten zeigten zu ca. 11% Mikrokerne und wiesen damit nach den Zellen des malignen Melanoms die höchste spontane Mikrokernfrequenz auf. Nach einer Bestrahlung der AT-Zellen mit 4 Gy erhöhte sich der Anteil der Mikrokern-enthaltenden Zellen auf etwa 23%. Das war nur der fünfthöchste Wert der hier getesteten Zelllinien. Bei Betrachtung der Vervielfachung der ursprünglichen Mikrokernfrequenz ergab sich ein Faktor von 2,1. Damit zeigten die hoch strahlensensiblen AT-Zellen den geringsten Wert der Vervielfachung der Mikrokernfrequenz überhaupt. Diese Diskrepanz ist möglicherweise durch Betrachtung des Modus des Zelltodes zu erklären.

Zellen können erstens einem mitotischen Zelltod unterliegen. Das heißt, es kommt zu einer Fehlverteilung der Chromosomen während der Mitose und als Folge zu einem reproduktiven Zelltod. Diese Art des Zelltodes wird mit dem Mikrokern-Assay gemessen. Zweitens gibt es den programmierten Zelltod, die Apoptose, während der Interphase. Da bei dem Mikrokern-Assay nur doppelkernige Zellen berücksichtigt werden, also Zellen, die sich einmal geteilt haben, entgehen dem Assay Aussagen über Zellen, die nach Bestrahlung vor der ers-

ten Mitose durch Apoptose zugrunde gehen. Beide Zelltodmodi wurden bei wachsenden Zellkulturen beschrieben [Akagi et al., 1993; Tauchi et al., 1994]. Möglicherweise spielt die Apoptose bei den AT-Zellen eine große Rolle. Guo et al. (1998) schlugen aufgrund der oben genannten Überlegungen vor, dass es sinnvoll sein könnte, in Zukunft den Mikrokern-Assay mit einem Apoptose-Assay zu kombinieren, um so beide Zelltodmodi erfassen zu können. Dem muss in Zukunft weiter nachgegangen werden.

Eine weitere Erklärung für die fehlende Korrelation von Kolonietest und Mikrokern-Assay bei Betrachtung verschiedener Zelllinien mag die Unfähigkeit einiger Zelllinien sein, Chromosomen-Fragmente in Mikrokerne umzuwandeln [Bush et al., 1993]. So könnten Chromosomen-Fragmente eingeschlossen im Zellkern nicht sichtbar persistieren und eventuell erst nach mehreren Zellteilungen zufällig vom Kern abgetrennt in Erscheinung treten.

Aus den ausgeführten Überlegungen wird deutlich, dass es wahrscheinlich zu sehr vereinfacht ist, die Anzahl der induzierten Mikrokerne mit der Strahlenempfindlichkeit von Zellen gleichzusetzen, da sehr viele Faktoren für die Bildung der Mikrokerne eine Rolle spielen. Die für jede Zelllinie individuell stark schwankende Neigung, Mikrokerne zu bilden, lässt eine klinische Anwendung dieses Testverfahrens zum jetzigen Zeitpunkt als nicht sinnvoll erscheinen.

4.4 Bemerkungen zur Mitoserate der Zelllinien im Mikrokern-Assay

Bei Vorversuchen mit dem Mikrokern-Assay wurden starke Unterschiede in der Teilungsfrequenz der Zelllinien, besonders nach höheren Bestrahlungsdosen, festgestellt. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen die Mitosefrequenz der Zellen mitbestimmt.

24 Stunden nach Bestrahlung der Tumorzellkulturen CHOR, GLIO und MEL mit 4 Gy fiel die Mitoserate dieser Zelllinien nur geringfügig ab bzw. blieb in etwa auf dem Level unbestrahlter Zellen (siehe Tabelle 3.6). Da Tumorzellen durch

den Verlust von Tumorsuppressorgenen etc. die Fähigkeit verloren haben, ihre Zellteilung bei auftretenden DNS-Schäden zu stoppen [Böcker et al., 2001], erscheinen diese Ergebnisse plausibel. Es ist davon auszugehen, dass ein Großteil der entstandenen Mikrokerne bei den Tumorzellen durch die hohe Teilungsfrequenz auch zu Tage tritt.

Im Gegensatz dazu verringerte sich die Anzahl doppelkerniger Zellen bei den Fibroblastenkulturen 48 Stunden nach Bestrahlungsende erheblich, und zwar bei allen Zelllinien in ungefähr gleichem Ausmaß. Nur noch 17-28% der ursprünglichen Mitoserate wurden nach Bestrahlung mit 4 Gy erreicht (Tabelle 3.6). Offensichtlich besitzen die Fibroblastenzellen die Fähigkeit, ihre Mitoserate zu drosseln, sobald DNS-Schäden aufgetreten sind. Beim Mikrokern-Assay werden aber nur dann DNS-Schäden als Mikrokerne sichtbar und gezählt, wenn die Zellen sich einmal geteilt haben. So können in Zellen vorhandene DNS-Schäden der Detektion mittels Mikrokern-Assay entgehen. Diese Tatsache kann mit zu einer fehlenden Korrelation zwischen Kolonietest und Mikrokern-Assay beigetragen haben.

Die Fibroblasten des Patienten mit Ataxia teleangiectasia verhielten sich in Bezug auf die Mitoserate deutlich anders als alle anderen getesteten Fibroblasten. Sie zeigten selbst nach Bestrahlung mit 4 Gy 69% der ursprünglichen Mitoserate. Eine Ursache für dieses Phänomen kann die Mutation des ATM-Gens der AT-Zellen sein, die über mehrere Zwischenschritte zu einer defekten Zellzykluskontrolle führt [Gatti et al., 2001]. Daraus resultiert hier offensichtlich eine relativ gesehen noch recht hohe Teilungsrate der AT-Zellen trotz aufgetretener DNS-Schäden.

4.5 Korrelationen zwischen Kolonietest und Comet-Assay

Bei einem Vergleich des Kolonietests mit dem Comet-Assay wurde zwischen dem Parameter SF2 und der Reparaturhalbwertszeit ($t_{0.5}$) eine hoch signifikante negative Korrelation ($R=-0,99$; $p<0,001$) bei Auslassen der Zelllinien FA und HFs (siehe Abbildung 3.23) gefunden. Dies bedeutet, dass Zelllinien mit einer geringeren Fraktion überlebender Zellen im Kolonietest auch eine längere Zeit

im Comet-Assay benötigten, um die entstandenen Brüche der DNS-Einzelstränge und die Zerstörung der DNS-Struktur an Alkali-labilen Stellen (ALS) zu reparieren. Die beiden Zelllinien FA und HFs konnten in diese Korrelation jedoch nicht mit einbezogen werden. Trotz ihrer relativ kurzen Reparaturhalbwertszeit im Comet-Assay waren sie im Kolonietest nach den AT-Zellen die empfindlichsten. Erstaunlicherweise waren es gerade diese beiden Zelllinien, die die höchsten α -Koeffizienten (FA: $\alpha = 0,7/\text{Gy}$; HFs: $\alpha = 0,66/\text{Gy}$; Tabelle 3.1) im Kolonietest aufwiesen. Betrachtet man den Koeffizienten als Hinweis auf dichter gepacktes Chromatin (siehe Abschnitt 4.2), ergibt sich die Frage, ob dieses zu einer schnelleren Reparatur von DNS-Schäden beitragen kann. Festzuhalten ist, dass bei der hier getesteten Fanconi-Anämie-Zelllinie und der Zelllinie des Patienten mit dem AT-ähnlichen Syndrom eine verlangsamte DNS-Reparatur nicht die Ursache der hohen Strahlensensibilität dieser Zellen im Kolonietest darstellt.

Weitere Korrelationen zwischen dem Parameter SF2 des Kolonietests und anderen Parametern des alkalischen Comet-Assays (TM_{IT} , TM_0 oder TM_R) konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Drei aktuelle Studien beschreiben ebenfalls Korrelationen zwischen dem Kolonietest und dem Comet-Assay. In diesen Studien wurden aber nur einheitliche Zelllinien getestet. So untersuchten McKeown et al. (2003) den Zusammenhang des SF2-Werts im Kolonietest mit dem Comet-Assay anhand von fünf Urothelkarzinom-Zelllinien. Dabei entdeckten sie eine signifikante Korrelation zwischen dem initialen DNS-Schaden im Comet-Assay und der Fraktion überlebender Zellen im Kolonietest nach Bestrahlung mit 1-6 Gy. Für vier der fünf Zelllinien wurde auch eine Korrelation zwischen dem residualen TM nach 30 Minuten und SF2 gefunden. Zwischen der Reparaturhalbwertszeit und SF2 wurde kein starker Zusammenhang entdeckt. Auch in einer früheren Studie von McKelvey-Martin et al. (1998) konnte ein Zusammenhang zwischen dem initialen DNS-Schaden und SF2 bei drei Blasentumor-Zelllinien gezeigt werden. Eine ähnliche Studie, ebenfalls mit Blasentumor-Zellen, wurde von Moneef et al. (2003)

durchgeführt. Auch hier wurde eine Korrelation zwischen dem initialen TM und der Fraktion überlebender Zellen nach verschiedenen Bestrahlungsdosen bei sechs verschiedenen Zelllinien gefunden. Zwischen dem residualen DNS-Schaden nach 15 bzw. 30 Minuten konnte ebenfalls eine Korrelation mit dem SF2-Wert des Kolonietests für fünf der sechs Zelllinien gefunden werden. Eine Korrelation zwischen der Reparaturhalbwertszeit und SF2 wurde nicht untersucht. Dunne et al. (2003) führten eine Studie mit vier Kolonkarzinom-Zelllinien durch. Sie fanden ebenfalls eine Korrelation zwischen dem initialen DNS-Schaden und dem Parameter SF2, aber keine zwischen der Reparaturhalbwertszeit und SF2. Brammer et al. (2001) zeigten mit einer Variante des alkalischen Comet-Assays, in welcher eine Lysezeit von nur 15 Minuten und eine Elektrophoresezeit von 4 Minuten in einem relativ starken elektrischen Feld gewählt wurde, eine Korrelation zwischen dem relativen initialen TM im Comet-Assay und dem Parameter SF2 des Kolonietests bei neun humanen Fibroblastenzelllinien. Sie konnten jedoch keine Korrelation zwischen der DNS-Reparaturkinetik und SF2 nachweisen. Zwei weitere Studien von Müller et al. (1994) und Bergqvist et al. (1998) konnten keine Korrelation zwischen dem initialen TM und dem Kolonietest bei der Untersuchung von zwei Plattenepithelkarzinomen und einer Melanomzelllinie bzw. bei vier Bronchialkarzinomen nachweisen.

Insgesamt existiert noch ein großer Forschungsbedarf, bis der Comet-Assay eine klinische Verwendung finden kann. Relativ unklar ist noch, welcher Parameter des Comet-Assays am besten mit dem Zellüberleben im Kolonietest, dem bisher verlässlichsten prädiktiven Test, korreliert. In den oben vorgestellten Studien scheint der initiale DNS-Schaden ein verlässlicher Parameter zu sein. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit eine Korrelation des Parameters SF2 mit der Reparaturhalbwertszeit gefunden.

Die Ursachen für diese Diskrepanz können vielfältig sein. Zum einen wurden in dieser Arbeit Zellen verschiedensten Ursprungs - Tumorzellen, normale Fibroblasten und Fibroblasten von Patienten mit genetischen Syndromen - verwendet. In den oben beschriebenen Studien wurden aber, abgesehen von der Studie von Brammer et al. (2001), nur Tumorzellen einer Tumorart verwendet.

Die hier verwendeten heterogenen Zelllinien könnten, zum Beispiel durch eine unterschiedliche Chromatin-Struktur im Zellkern, eine unterschiedliche Neigung dazu haben, Kometen zu bilden.

Selbst bei Zelllinien mit einer identischen Anzahl von Strangbrüchen konnten Dikomey et al. Unterschiede im initialen TM nachweisen [Dikomey et al., 1998; 2000]. So kann ein hohes initiales TM auch bedeuten, dass während der Elektrophorese die aufgewundene oder fragmentierte DNS relativ gesehen leichter vom Kern gelöst wird und in Richtung der Anode wandern kann. Eine Ursache dafür kann eine unterschiedlich enge Verbindung der DNS zur nukleären Matrix, bestehend aus Histonen und anderen Proteinen, sein. Für AT-Zellen wurde in mehreren Veröffentlichungen solch eine defekte Chromatinstruktur beschrieben [Taylor et al., 1991; Pandita et al., 1992]. Ein Grund für die suboptimale Anheftung der DNS der AT-Zellen an die nukleäre Matrix soll durch eine gestörte Interaktion mit den Telomeren bedingt sein [Pandita et al., 2000]. In dieser Arbeit zeigte die AT-Zelllinie aber kein hohes initiales TM (siehe Tabelle 3.7). Möglicherweise gibt es selbst unter den verschiedenen AT-Zelllinien, denen viele verschiedene Mutationen zu Grunde liegen können (siehe Abschnitt 1.5), noch Unterschiede in der Chromatinstruktur.

Die Fibroblasten zeigten in dieser Arbeit insgesamt wenig Unterschiede im initialen TM. Dies wurde auch schon von anderen Autoren festgestellt [McKeown et al., 2003]. Im Gegensatz dazu variierte die Reparaturhalbwertszeit der Fibroblasten zwischen 2,8-17 Minuten. Möglicherweise wird sich in weiteren Studien die Reparaturhalbwertszeit aufgrund ihrer großen Variabilität als geeigneter Parameter zur Differenzierung der Strahlensensibilität von Fibroblasten erweisen.

Ein großer Nachteil der oben beschriebenen Studien ist die äußerst geringe Zahl der getesteten Zelllinien. Die Verwendung von nur drei [McKelvey-Martin et al., 1998] bis sechs [Moneef et al., 2003] Zelllinien erscheint viel zu gering, um allgemein gültige Aussagen über die Strahlensensibilität der getesteten Tumoridentitäten treffen zu können. Auch die hier verwendeten acht Zelllinien sind bei den heterogenen Eigenschaften der Zelllinien sehr wenig. Möglicher-

weise hätte sich bei der Verwendung von mehr Zelllinien auch eine Korrelation zwischen dem initialen DNS-Schaden im Comet-Assay und dem Kolonietest gezeigt.

In Zukunft wird es wichtig sein, zu untersuchen, ob die im Labor gefundenen Korrelationen zwischen Kolonietest und Comet-Assay auch das klinische Ansprechen von Tumoren auf eine Bestrahlung widerspiegeln, bzw. die Radiosensibilität der Normalzellen von Patienten wiedergeben. Djuzenova et al. (1999) konnten zeigen, dass heterozygote AT-Genträger und AT-Patienten eine signifikant langsamere Reparatur zeigten als gesunde Spender. Oppitz et al. (1999) fanden einen Zusammenhang zwischen einer verzögerten DNS-Reparatur und dem Auftreten von schweren Strahlennebenwirkungen von Patienten. Dies deutet darauf hin, dass die Reparaturhalbwertszeit tatsächlich nicht nur mit dem Parameter SF2 korreliert, sondern möglicherweise auch die klinische Empfindlichkeit von Patienten wiedergibt. Um diesen Zusammenhang genauer erforschen zu können, werden Studien mit großen Patientenkollektiven nötig sein.

Auch mit dem bereits länger verwendeten neutralen Comet-Assay wurde nach Korrelationen mit dem Kolonietest gesucht. Mit dem neutralen Comet-Assay werden nach gängiger Ansicht spezifisch Doppelstrangbrüche nachgewiesen [Olive et al., 1995]. Klaude et al. (1996) zogen aber die Möglichkeit in Betracht, dass der neutrale Comet-Assay zwar Bereiche mit aufgehobener Sekundär- und Tertiärstruktur der DNS erkennt, die aber nicht notwendigerweise durch Doppelstrangbrüche entstanden sein müssen.

Ein offensichtlicher Nachteil des neutralen Comet-Assays sind die hohen Bestrahlungsdosen, in der Regel weit über 10 Gy, die klar über den klinisch üblichen Einzelfractionen liegen. Bei Verwendung solcher Strahlendosen ist davon auszugehen, dass zumindest bei Fibroblasten ein Großteil der Zellen nach der Bestrahlung tot ist. Obwohl Doppelstrangbrüche für das Zellüberleben eine bedeutende Rolle spielen (siehe Abschnitt 1.2), scheinen Assays, die unter

solch klinikfernen Bedingungen durchgeführt werden, wenig Erfolg versprechend für eine klinische Anwendung.

Einige Autoren konnten dennoch Korrelationen zwischen dem Kolonietest und dem neutralen Comet-Assay nachweisen. So beschreiben zwei Studien eine Korrelation zwischen dem Quotienten aus initialen und residualen DNS-Schaden und dem SF2-Wert bei sieben Zervixkarzinom-Zelllinien nach Bestrahlung mit 60 Gy [Marples et al., 1998] bzw. bei Fibroblasten mit 180 Gy [Eastham et al., 1999]. Eine andere Studie beschreibt eine Korrelation zwischen dem DNS-Schaden im neutralen Comet-Assay und der Fraktion überlebender Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy (SF10), konnten aber keine Korrelation des induzierten DNS-Schadens mit dem Parameter SF2 nachweisen. Auch eine Korrelation mit der Reparaturkinetik wurde in dieser Studie nicht nachgewiesen [Price et al., 2000]. Dagegen bestand in einer anderen Versuchsreihe eine Korrelation zwischen SF2 und der schnellen Komponente der DNS-Reparatur [Nunez et al., 1995]. In einer weiteren Studie [Olive et al., 1994] wird gar keine Korrelation zwischen Parametern des neutralen Comet-Assays und dem Kolonietest belegt.

4.6 Korrelationen zwischen Mikrokern-Assay und Comet-Assay

In den vorangegangenen Abschnitten wurde der Kolonietest mit dem Mikrokern-Assay einerseits und dem Comet-Assay andererseits verglichen. Besonders beim Mikrokern-Assay wurde auf die Schwierigkeit hingewiesen, dass Mikrokernbildung bei dem Vergleich von verschiedenen Zelllinien nicht ohne weiteres mit der Strahlensensibilität der Zelllinien gleichgesetzt werden kann.

So ist es auch nicht verwunderlich, dass für das initiale TM und den prozentualen Anteil mikrokernhaltiger Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy keine Korrelation gefunden werden konnte (Abbildung 3.24). Auch zwischen der Reparaturhalbwertszeit $t_{0.5}$ bzw. dem residualen TM und der Rate mikrokernhaltiger Zellen wurde keine Korrelation nachgewiesen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Malcolmson et al. (1995) bei Versuchen mit Lymphozyten. Sie konnten keine Korrelationen zwischen dem initialen oder

residualen DNS-Schaden des Comet-Assays mit Parametern des Mikrokern-Assays finden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden acht Zelllinien unterschiedlicher Herkunft mit einer großen Variationsbreite der klinischen Strahlensensibilität anhand von drei etablierten Testmethoden - dem Kolonietest, dem Mikrokern-Assay und dem Comet-Assay - untersucht. Unter den Zelllinien befanden sich Fibroblasten von Patienten mit den hereditären Syndromen Ataxia teleangiectasia (AT) und Fanconi-Anämie (FA), zwei Zelllinien von klinisch durchschnittlich strahlensensiblen Patienten (117HF, 118HF) und Zellen eines sehr sensiblen Patienten mit einem AT-ähnlichen Syndrom (HFs). Außerdem wurden drei Tumorzelllinien, ein malignes Melanom (MEL), ein Chorionkarzinom (CHOR) und ein Glioblastom (GLIO), getestet. Bei jedem verwendeten Verfahren wurde zunächst das Verhalten der einzelnen Zelllinien beobachtet und anschließend versucht, Korrelationen zwischen den Testverfahren zu finden.

Hervorzuhebende Ergebnisse sind:

- Mit dem Kolonietest wurden alle acht Zelllinien in einer Reihenfolge angeordnet, die der erwarteten klinischen Strahlenempfindlichkeit entspricht.
- Für alle Zelllinien wurde im Mikrokern-Assay eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen.
- Zwischen der Fraktion überlebender Zellen im Kolonietest und dem prozentualen Anteil mikrokernhaltiger Zellen im Mikrokern-Assay konnte für Bestrahlungsdosen von 1, 2 und 3 Gy für sechs der acht Zelllinien eine statistisch signifikante Korrelationen jeweils innerhalb einer Zelllinie nachgewiesen werden. Beim Vergleich verschiedener Zelllinien untereinander zeigte sich jedoch zwischen dem Parameter SF2 und dem Anteil an Zellen mit Mikrokernen nach Bestrahlung mit 2 Gy keine Korrelation. Offensichtlich besitzt also jede Zelllinie eine individuell unterschiedliche

Neigung Mikrokerne zu bilden, die aber dosisabhängig mit der Fraktion überlebender Zellen im Kolonietest korreliert.

- Im Mikrokern-Assay blieb die Mitoserate der Tumorzellen nach Bestrahlung mit 1-4 Gy ungefähr auf dem Level der unbestrahlten Zellen. Die Fibroblasten verringerten hingegen ihre Teilungsfrequenz auf unter 30% des jeweiligen Ausgangswertes. Interessanterweise reduzierten die Fibroblasten des AT-Patienten die Mitoserate nur auf 69%. Dies kann als Zeichen für eine defekte Zellzykluskontrolle durch Mutation im ATM-Gen gewertet werden.
- Es zeigte sich weiter eine statistisch signifikante negative Korrelation ($R=-0,99$; $p<0,001$) zwischen der Reparaturhalbwertszeit $t_{0,5}$ im Comet-Assay und dem Parameter SF2 des Kolonietests für sechs der acht Zelllinien. Für diese Zelllinien scheint die Reparaturgeschwindigkeit in den ersten Minuten nach der Bestrahlung entscheidend für das Langzeitüberleben zu sein. Die beiden nicht mit dieser Korrelation zu vereinbarenden Zelllinien HFs und FA besaßen im Kolonietest deutlich höhere α -Koeffizienten, was auf eine starke Kondensation des Chromatins dieser Zellen hinweisen kann.
- Zwischen dem initialen DNS-Schaden (TM_{IT}), dem für die Zellen reparablen DNS-Schaden (TM_0) oder residualen DNS-Schaden (TM_R) des Comet-Assays und dem Parameter SF2 des Kolonietests konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden.
- Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen Parametern des Mikrokern-Assays und des Comet-Assays bestand nicht.

Vergleichbar mit Ergebnissen von O'Driscoll et al. (1998) und Akudugu et al. (2000) konnte keine Korrelation zwischen Parametern des Kolonietests und des Mikrokern-Assays von verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen dafür können die verschiedenen Polyploidiegrade der verwendeten Zellen, die unterschiedliche Verteilung der Zellen über die verschiedenen Zellzyklusphasen während der Bestrahlung, verschiedene Zelltodmodi oder eine geringere Neigung einiger Zelllinien sein, DNS-Fragmente als Mikrokerne

in Erscheinung treten zu lassen. Auch eine stark reduzierte Mitoserate, besonders nach Bestrahlung der Fibroblasten, kann das sichtbar werden von Mikrokernen verhindert haben. Aufgrund dieser zahlreichen Einflussfaktoren erscheint es zu vereinfacht, den Anteil an Zellen mit Mikrokernen als einzelnen Parameter für die Messung von Strahlensensibilität zu verwenden. Somit bleibt auch eine mögliche Anwendung des Mikrokern-Assays als prädiktiver Test in der Strahlentherapie zunächst fraglich.

Trotz der sehr heterogenen Zelllinien konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Parameter SF2 im Kolonietest und der Reparaturhalbwertszeit im Comet-Assay für sechs der acht getesteten Zelllinien nachgewiesen werden. Zusammen mit den Ergebnissen aus weiteren neuen Studien von McKelvey-Martin et al. (1998), McKeown et al. (1999; 2003), Brammer et al. (2001) und Moneef et al. (2003) verdichten sich so die Hinweise darauf, dass tatsächlich eine Korrelation von Comet-Assay und Kolonietest existiert. Außerdem konnte in einigen Studien bereits eine Korrelation des Comet-Assays mit der klinischen Strahlensensibilität von Patienten nachgewiesen werden [Alapetite et al., 1999; Oppitz et al., 1999]. Dies gibt Anlass zur Hoffnung, dass der Comet-Assay den sehr zeitaufwendigen und längst nicht mit allen Zelllinien durchführbaren Kolonietest vielleicht ersetzen kann. Für den Comet-Assay selbst werden nur einige tausend Zellen benötigt und die Ergebnisse können innerhalb eines Tages zur Verfügung stehen. Dies macht ihn sehr geeignet für eine klinische Anwendung. Über den am besten geeigneten Parameter des Comet-Assays besteht noch keine Einigkeit. Möglicherweise stellt sich auch heraus, dass für verschiedene Zellarten (Fibroblasten, Tumorzellen) verschiedene Parameter am zuverlässigsten die klinische Strahlensensibilität vorhersagen können. Dafür werden große klinische Studien notwendig, die die Strahlenempfindlichkeit von Tumoren, bzw. die Reaktion der Normalgewebe von Patienten auf eine Bestrahlung, mit den Parametern des Comet-Assays vergleichen. Insgesamt scheint der Comet-Assay ein vielversprechendes Verfahren zu sein, welches die Hoffnung weckt, dass zumindest für definierte Indikationen in naher Zukunft ein prädiktiver Test für eine klinische Anwendung zur Verfügung stehen wird.

6 Literaturverzeichnis

Akagi Y, Ito K, Sawada S: Radiation-induced apoptosis and necrosis in Molt-4 cells: a study of dose-effect relationships and their modification.

Int J Radiat Biol. 1993;64:47-56.

Akudugu JM, Slabbert JP, Serafin A, Bohm L: Frequency of radiation-induced micronuclei in neuronal cells does not correlate with clonogenic survival.

Radiat Res. 2000;153:62-67.

Alapetite C, Thirion P, de la Rochefordiere A, Cosset JM, Moustacchi E: Analysis by alkaline comet assay of cancer patients with severe reactions to radiotherapy: defective rejoining of radioinduced DNA strand breaks in lymphocytes of breast cancer patients.

Int J Cancer. 1999;83:83-90.

Alsbeih G, Malone S, Lochrin C, Girard A, Fertil B, Raaphorst GP: Correlation between normal tissue complications and in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts derived from radiotherapy patients treated for variety of tumors.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2000;46:143-152.

Armima T, Imamura T, Amada S, Tsuneyoshi M and Wake N: Genetic origin of malignant trophoblastic neoplasms.

Cancer Genet. Cytogenet. 1994;73:95-102.

Auerbach AD, Wolman SR: Susceptibility of Fanconi's anemia fibroblasts to chromosome damage by carcinogens.

Nature 1976;261:494-496.

Bauch T, Böcker W, Mallek U, Müller WU, Streffer C: Optimization and standardization of the „comet assay“ for analyzing the repair of DNA damage in cells.

Strahlenther Onkol. 1999;175:333-340.

Beral V, Evans S, Shaw H, Milton G: Cutaneous factors related to the risk of malignant melanoma.

Br J Dermatology. 1983;109:165-172.

Bergqvist M, Brattstrom D, Stahlberg M, Vaghef H, Brodin O, Hellman B: Evaluation of radiation-induced DNA damage and DNA repair in human lung cancer cell lines with different radiosensitivity using alkaline and neutral single cell gel electrophoresis.

Cancer Lett. 1998;133:9-18.

Böcker W, Denk H, Heitz PhU: Pathologie.

Urban und Fischer Verlag München; 2. Auflage Januar 2001.

Brammer I, Zoller M, Dikomey E.: Relationship between cellular radiosensitivity and DNA damage measured by comet assay in human normal, NBS and AT fibroblasts.

Int J Radiat Biol. 2001;77:929-938.

Burnet NG, Nymann J, Turesson I, Wurm R, Yarnold JR, Peacock JH.: The relationship between cellular radiation sensitivity and tissue response may provide the basis for individualising radiotherapy schedules.

Radiother Oncol. 1994;33:228-238.

Burnet NG, Wurm R, Tait DM, Peacock JH: Cellular sensitivity and low dose-rate recovery in Fanconi anaemia fibroblasts.

Br J Radiol. 1994;67:579-583.

Bush C, McMillan TJ: Micronucleus formation in human tumour cells: lack of correlation with radiosensitivity.

Br J Cancer. 1993;67:102-106.

Carreau M, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Joenje H, Buchwald M: Drug sensitivity spectra in Fanconi anemia lymphoblastoid cell lines of defined complementation groups.

Mutat Res. 1999;435:103-109.

Champion AR, Hanson JA, Court JB, Venables SE: The micronucleus assay: an evaluation of its use in determining radiosensitivity in vitro.

Mutagenesis. 1995;10:203-208.

Chapman JD, Stobbe CC, Matsumoto Y: Chromatin compaction and tumor cell radiosensitivity at 2 gray.

Am J Clin Oncol. 2001;24:509-515.

Chapman JD: Single-hit mechanism of tumour cell killing by radiation.

Int J Radiat Biol. 2003;79:71-81. Review.

Concannon P, Gatti RA: Diversity of ATM gene mutations detected in patients with ataxia-telangiectasia.

Hum Mutat. 1997;10:100-107. Review.

Dahm-Daphi J, Dikomey E et al.: DNS-repair, cell killing and normal tissue damage.

Strahlenther Onkol. 1998;174:Suppl III:8-11.

Daza P, Reichenberger S, Göttlich B, Hagmann M, Feldmann E, Pfeiffer P: Mechanisms of nonhomologous DNA end-joining in frogs, mice and men.

Biol Chem. 1996;377:775-786.

Dikomey E, Brammer I: Relationship between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied for different growth states, dose rates and plating conditions in a normal human fibroblast line.

Int J Radiat Biol. 2000;76:773-781.

Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B: Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines.

Int J Radiat Biol. 1998;73:269-278.

Djuzenova CS, Rothfuss A, Oppitz U, Speit G, Schindler D, Hoehn H, Flentje M: Response to X-irradiation of Fanconi anemia homozygous and heterozygous cells assessed by the single-cell electrophoresis (comet) assay.

Lab Invest. 2001;81:185-192.

Djuzenova CS, Schindler D, Stopper H, Hoehn H, Flentje M, Oppitz U: Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer-prone population, using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay.

Lab Invest. 1999;79:699-705.

Duckworth-Rysiecki G, Taylor AMR: Effects of ionizing radiation on cells from Fanconi's anemia patients.

Cancer Res. 1985;45:416-420.

Dunne AL, Price ME, Mothersill C, Robson T, Hirst DG: Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells.

Br J Cancer. 2003;89:2277-2283.

Eastham AM, Marples B, Kiltie AE, Orton CJ, West CM: Fibroblast radio-sensitivity measured using the comet DNA-damage assay correlates with clonogenic survival parameters.

Br J Cancer. 1999;79:1366-1371.

Fenech M, Morley AA: Measurement of micronuclei in lymphocytes.

Mutat Res. 1985;147:29-36.

Gatti RA, Becker-Catania S, Chun HH, Sun X, Mitui M, Lai CH, Khanlou N, Babaei M, Cheng R, Clark C, Huo Y, Udar NC, Iyer RK: The pathogenesis of ataxia-telangiectasia. Learning from a Rosetta Stone.

Clin Rev Allergy Immunol. 2001;20:87-108. Review.

Gatti RA, Berkel I, Boder E, Braedt G, Charmley P, Concannon P, Ersoy F, Foroud T, Jaspers NG, Lange K et al.: Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23.

Nature 1988;336:577-580.

Guo GZ, Sasai K, Oya N, Takagi T, Shibuya K, Hiraoka M: Simultaneous evaluation of radiation induced apoptosis and micronuclei in five cell lines.

Int J Radiat Biol. 1998;73:297-302.

Hermann T, Baumann M: Klinische Strahlenbiologie.

Gustav Fischer Verlag Jena. 1997;3. Auflage.

Högstedt B, Karlsson A: The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used.

Mutat Res. 1985;156:229-232.

Joenje H, Arwert F, Eriksson AX, de Koning H, Oostra AB: Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia.

Nature. 1981;290:142-143.

Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G, Winegar RA: The comet assay: mechanisms and technical considerations.

Mutat Res. 1996;363:89-96.

Kozarek RA, Sanowski RA: Carcinoma of the esophagus associated with Fanconi's anemia.

J Clin Gastroenterol. 1981;3:171-174.

Kozehvnikov BA, Khodorenko CA: Cancer of the mucous membrane of the left side of the mouth associated with congenital hypoplastic Fanconi's anemia in a 14-year-old boy.

Vestn Khir. 1986;136:105-106.

Linke SP, Clarkin KC, Wahl GM: p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation.

Cancer Res. 1997;57:1171-1179.

Lustig JP, Lugassy G, Neder A, Sigler E: Head and neck carcinoma in Fanconi's anaemia - report of a case and review of the literature.

Oral Oncol Eur J Cancer. 1995;31:68-72.

Lutze LH, Cleaver JE, Morgan WF, Winegar RA: Mechanisms involved in rejoining DNA double-strand breaks induced by ionizing radiation and restriction enzymes.

Mutat Res. 1993;299:225-232.

Maity A, McKenna WG, Muschel RJ: The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review.

Radiother Oncol. 1994;31:1-13.

Malcolmson AM, Davies G, Hanson JA, Deeley JO, Gaffney CC, McGregor AD, Kerby IJ.: Determination of radiation-induced damage in lymphocytes using the micronucleus and microgel electrophoresis 'Comet' assays.

Eur J Cancer. 1995;31:2320-2323.

Marcou Y, D'Àndrea A, Jeggo PA, Plowman PN: Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity.

Radiother Oncol. 2001;60:75-79.

Marples B, Longhurst D, Eastham AM, West CM: The ratio of initial/residual DNA damage predicts intrinsic radiosensitivity in seven cervix carcinoma cell lines.

Br J Cancer. 1998;77:1108-1114.

McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review.

Mutat Res. 1993;288:47-63. Review.

McKelvey-Martin VJ, Ho ET, McKeown SR, Johnston SR, McCarthy PJ, Rajab NF, Downes CS: Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells.

Mutagenesis. 1998;13:1-8.

McKeown SR, Robson T, Price ME, Ho ETS, Hirst DG, McKelvey-Martin VJ: Potential use of the alkaline comet assay as a predictor of bladder tumour response to radiation.

Br J Cancer. 2003;89:2264-2270.

Mitchell EL, Scott D: G₂ chromosomal radiosensitivity in fibroblasts of ataxia telangiectasia heterozygotes and Li-Fraumeni syndrome patients with radio-resistant cells.

Int J Radiat Biol. 1997;72:435-438.

Moneef MA, Sherwood BT, Bowman KJ, Kockelbergh RC, Symonds RP, Steward WP, Mellon JK, Jones GD: Measurements using the alkaline comet assay predict bladder cancer cell radiosensitivity.

Br J Cancer. 2003;89:2271-2276.

Morrell D, Cromatie E, Swift M: Mortality and cancer incidence in 263 patients with ataxia-telangiectasia.

J Natl Cancer Inst. 1986;77:89-92.

Müller WU, Bauch T, Streffer C, Niedereichholz F, Bocker W: Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines.

Int J Radiat Biol. 1994;65:315-319.

Nachtrab U, Oppitz U, Flentje M, Stopper H: Radiation-induced micronucleus formation in human skin fibroblasts of patients showing severe and normal tissue damage after radiotherapy.

Int J Radiat Biol. 1998;73:279-287.

Naiem A, Repinsky C, Huo Y, Hong JH, Chessa L, Naiem F, Gatti RA: Ataxia-telangiectasia: Flow cytometric cell-cycle analysis of lymphoblastoid cell lines in G₂/M before and after γ -irradiation.

Mod Pathol. 1994;7:587-592.

Norman A, Kagan AR, Chan SL: The importance of genetics for the optimization of radiation therapy. A hypothesis.

Am J Clin Oncol. 1988;11:84-88.

Nunez MI, Villalobos M, Olea N, Valenzuela MT, Pedraza V, McMillan TJ, Ruiz de Almodovar JM: Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumour cells.

Br J Cancer. 1995;71:311-316.

O'Driscoll MC, Scott D, Orton CJ, Kiltie AE, Davidson SE, Hunter RD, West CM: Radiation-induced micronuclei in human fibroblasts in relation to clonogenic radiosensitivity.

Br J Cancer. 1998;78:1559-1563.

Olive PL, Banath JP, Durand RE: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet assay".

Radiat Res. 1990;122:86-94.

Olive PL, Banath JP, MacPhail HS: Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines.

Cancer Res. 1994;54:3939-3946.

Olive PL, Banath JP: Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay.

Radiat Res. 1995;142:144-152.

Oppitz U, Baier K, Wulf J, Schakowski R, Flentje M: The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome.

Int J Radiat Biol. 2001;77:105-110.

Oppitz U, Denzinger S, Nachtrab U, Flentje M, Stopper H: Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions.

Strahlenther Onkol. 1999;175:431-436.

Ostling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.

Biochem Biophys Res Comm. 1984;123:291-298.

Pandita TK, Dhar S: Influence of ATM function on interactions between telomeres and nuclear matrix.

Radiat Res. 2000;154:133-139.

Pandita TK, Hittelman WN: Initial chromosome damage but not DNA damage is greater in ataxia telangiectasia cells.

Radiat Res.1992;130:95-103.

Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J: Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy.

Radiother Oncol. 2000;55:173-178.

Peters LJ: Inherent radiosensitivity of tumor and normal tissue cells as a predictor of human tumor response.

Radiother Oncol. 1990;17:177-190.

Phillips JW, Morgan WF: Illegitimate recombination induced by DNA double-strand breaks in a mammalian chromosome.

Mol Cell Biol. 1994;14:5794-5803.

Pinsker MO, Goetz C, Walther EU, Dudel C, Grosu AL, Reich P, Schalhorn A, Elbel GK: Höhergradige Gliome und Gliomatosis cerebri.

Manual Hirntumoren und primäre Tumoren des Rückenmarks, Aufl. 2001; Tumorzentrum München.

Pomp J, Wike JL, Ouwerkerk IJ, Hoogstraten C, Davelaar J, Schrier PI, Leer JW, Thames HD, Brock WA: Cell density dependent plating efficiency affects outcome and interpretation of colony forming assays. *Radiother Oncol.* 1996;40:121-125.

Popanda O, Ebbeler R, Twardella D, Helmbold I, Gotzes F, Schmezer P, Thielmann HW, von Fournier D, Haase W, Sauter-Bihl ML, Wenz F, Bartsch H, Chang-Claude J: Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;55:1216-1225.

Price ME, McKelvey-Martin VJ, Robson T, Hirst DG, McKeown SR: Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in bladder tumor cells. *Radiat Res.* 2000;153:788-794.

Puck TT, Marcus PI: Action of X-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 1956;103:653-666.

Rached E, Schindler R, Beer KT, Vetterli D, Greiner RH: No predictive value of the micronucleus assay for patients with severe acute reaction of normal tissue after radiotherapy. *Eur J Cancer.* 1998;34:378-383.

Regueiro JR, Porras W, Lavin M, Gatti RA: Ataxia-telangiectasia - a primary immunodeficiency revisited. *Primary T-Cell Immunodeficiencies.* 2000;20:177-206.

Revell SH: Relationships between chromosome damage and cell death. In: *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*, New York: Alan R. Liss (1983), Inc., p.215-233.

Rodemann HP, Bamberg M: Cellular basis of radiation-induced fibrosis.
Radiother Oncol. 1994;35:83-90.

Rudat V, Dietz A, Conradt C, Weber KJ, Flentje M: In vitro radiosensitivity of primary human fibroblasts. Lack of correlation with acute radiation toxicity in patients with head and neck cancer.
Radiother Oncol. 1997;43:181-188.

Rydberg B, Johanson KJ: Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells.
In *DNA Repair Mechanisms*, edited by Hanawalt PC, Friedberg EC and Fox CF
New York: Academic Press 1978;pp. 465-468.

Sandberg AA: Chromosome breakage syndromes. In: Sandberg AA, editor.
The chromosomes in Human Cancer and Leukemia.
New York: Elsevier. 1980;p.152-170.

Sasaki MS, Tonomura A: A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents.
Cancer Res. 1973;33:1829-1836.

Sause WT, Cooper JS, Rush S, Ago CT, Cosmatos D, Coughlin CT, JanJan N, Lipsett J: Fraction size in external beam radiation therapy in the treatment of malignant melanoma.
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1991;20:429-432.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotmann G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S et al.: A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase.
Science. 1995;268:1749-1753.

Schiffmann D, DeBoni U: Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise.

Mutat Res. 1991;246:113-122.

Schmid E, Zitzelsberger H, Braselmann H, Gray JW, Bauchinger M: Radiation-induced chromosome aberrations analysed by in situ hybridization with a triple combination of composite whole chromosome-specific DNA probes. Int J Radiat Biol. 1992;62:637-638.

Schott H et al.: Die Chronik der Medizin.

Chronik Verlag Harenberg im Bertelsmann-Lexikon Verlag GmbH;
Gütersloh/München; 1.Auflage 1993.

Schröder TM: Spontaneous chromosomal instability in the rare hereditary diseases: Fanconi's anemia and Bloom's syndrome.

Dtsch Med Wochenschr. 1973;98:2213-2215.

Scott D, Hu Q, Roberts SA: Dose-rate sparing for micronucleus induction in lymphocytes of controls and ataxia-telangiectasia heterozygotes exposed to ^{60}Co γ -irradiation in vitro.

Int J Radiat Biol. 1996;70:521-527.

Seyschab H, Schindler D, Friedl R, Barbi G, Bolthausen E, Fryns JP, Hanefeld F, Korinthenberg R, Krägeloh-Mann I, Scheres JM, Schinzel A, Seemanova E, Tommerup N, Hoehn H: Simultaneous measurement, using flow cytometry, of radiosensitivity and defective mitogen response in ataxia telangiectasia and related syndromes.

Eur J Pediatr. 1992;151:756-760.

Shibamoto Y, Streffer C, Fuhrmann C, Budach V: Tumor radiosensitivity prediction by the cytokinesis-block micronucleus assay.

Radiat Res. 1991;128:293-300.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Scheider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.

Exp Cell Res. 1988;175:184-191.

Slonina D, Klinek M, Szpytma T, Gasinska A: Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal - tissue reactions after radiotherapy.

Int J Radiat Biol. 2000;9:1255-1264.

Strathdee CA, Buchwald M: Molecular and cellular biology of Fanconi anemia.

Am J Pediatr Hematol Oncol. 1992;14:177-185.

Swift PS, Fu KK: Radiation therapy for melanoma.

In Leong SPL, ed. Malignant Melanomas: Advances in Treatment.

Boca Raton, Fla: CRC Press 1992:64.

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW: The double-strand break repair model for recombination.

Cell. 1983;33:25-35.

Taghian A, DuBois W, Budach W, Baumann M, Freeman J, Suit H: In vivo sensitivity of glioblastoma multiforme.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1995;32:99-104.

Taghian A, Suit H, Pardo F, Gioioso D, ToMKinson K, DuBois W, Gerweck L: In vitro intrinsic radiation sensitivity of glioblastoma multiforme.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1992;23:55-62.

Tauchi H, Sawada S.: Analysis of mitotic cell death caused by radiation in mouse leukaemia L5178Y cells: apoptosis is the ultimate form of cell death following mitotic failure.

Int J Radiat Biol. 1994;65:449-455.

Taylor AM, Harnden DG, Arlett CF, Harcourt SA, Lehmann AR, Stevens S, Bridges BA: Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity.

Nature. 1975;258:427-429.

Taylor YC, Duncan PG, Zhang X, Wright WD.: Differences in the DNA supercoiling response of irradiated cell lines from ataxia-telangiectasia versus unaffected individuals.

Int J Radiat Biol. 1991;59:359-371.

Tchirkov A, Bay JO, Pernin D, Bignon YJ, Rio P, Grancho M, Kwiatkowski F, Giollant M, Malet P, Verrelle P: Detection of heterozygous carriers of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene by G₂ phase chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes.

Hum Genet. 1997;101:312-316.

Tidy JA, Rustin GJ, Newlands ES, Foskett M, Fuller S, Short D, Rowden P: Presentation and management of choriocarcinoma after nonmolar pregnancy.

Br J Obstet Gynaecol. 1995;102:715-719.

Twardella D, Popanda O, Helmbold I, Ebbeler R, Benner A, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Schmezer P, Chang-Claude J: Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy.

Radiother Oncol. 2003;69:145-153.

Villa R, Zaffaroni N, Gornati D, Costa A, Silvestrini R: Lack of a correlation between micronucleus formation and radiosensitivity in established and primary cultures of human tumours.

Br J Cancer. 1994;70:1112-1117.

Wallace SS: DNA damage processed by excision repair: biological consequences.

Int J Radiat Biol. 1994;66:579-589.

Wandl EO, Ono K, Kain R, Herbsthofer T, Hienert G, Hobarth K: Linear correlation between surviving fraction and the micronucleus frequency.

Int J Radiat Biol. 1989;56:771-775.

Weichselbaum RR, Nove J, Little JB: X-ray sensitivity of fifty-three human diploid fibroblast cell strains from patients with characterized genetic disorders.

Cancer Res. 1980;40:920-925.

West CM, Elyan SA, Berry P, Cowan R, Scott D: A comparison of the radio-sensitivity of lymphocytes from normal donors, cancer patients, individuals with ataxia-telangiectasia (A-T) and A-T heterozygotes.

Int J Radiat Biol. 1995;68:197-203.

West CM, Hendry JH, Scott D, Davidson SE, Hunter RD: 25th Paterson Symposium - Is there a future for radiosensitivity testing?

Br J Cancer. 1991;64:197-199.

Widel M, Dobrut M, Maka B, Lubecka B, Pluciennik A: The radiosensitivity of human malignant melanomas evaluated by cytokinesis-block micronucleus assay.

Neoplasma. 1997;44:109-116.

Wilkinson EJ, Morgan LS, Friedrich EG Jr: Association of Fanconi's anemia and squamous-cell carcinoma of the lower female genital tract with condyloma acuminatum. A report of two cases.

J Reprod Med. 1984;29:447-453.

7 Anhang

7.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	D-6046, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	D-8537, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fetales Kälberserum (FCS)	F-7524, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutamin 200 mM	G-7513, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin 10000 IE/ml / Streptomycin 10 mg/ml	P-4333, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RPMI 1640	R-8758, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung, 0,5% EDTA	T-3924, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung, 0,2% EDTA	T-4174, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

7.2 Chemikalien

Acridine Orange	A-4921, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agarose Low Melt	6351.1, Roth, Karlsruhe
Agarose MEEO (high melting)	2268.2, Roth, Karlsruhe
Crystal Violet	C-3886, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cytochalasin B	C-6762, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	D-5879, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure	A0820, AppliChem, Darmstadt
HCl (Salzsäure)	A0658, AppliChem, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	26870, Serva, Heidelberg
Lauroylsarcosine Na Salz	L-5125, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol	4627.5, Roth, Karlsruhe
Na ₂ EDTA-dihydrate	E-5134, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NaCl (Kochsalz)	S-5886, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

NaH ₂ PO ₄	S-7907, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NaOH	K021.1, Roth, Karlsruhe
Triton X-100	X-100, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TRIZMA Base (=Tris)	T-1503, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

7.3 Glas- und Plastikmaterialien

Glaswaren	Hartenstein, Würzburg Noras, Würzburg
Plastikwaren	Becton and Dickinson, Falcon TM , Heidelberg

7.4 Geräte und spezielle Materialien

Autoklav	Melag Typ 28, Melag, Berlin
Bildverarbeitungssoftware	Komet Analysis, Version 3.1, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, GB Kinetic Analysis Macro for Excel, Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, GB
Brutschränke	Typ BB5060; Heraeus Instruments, Hanau Nuaire TM US Autoflow, Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Cobalt-Telegamma-Gerät	⁶⁰ Co-Theratron 780C, Philips, Crowley, GB
Elektrophoresekammer	Typ 20-10; Stratagene, Heidelberg
Feinwaage	SBA32; Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Filter für Fluoreszenzmikroskop für Propidiumjodid	Leica, Wetzlar, Anregungsfilter 515-560 nm, Sperrfilter 590 nm
für Acridine-Orange	Anregungsfilter 450-490 nm, Sperrfilter 515 nm

Fluoreszenzmikroskop	Leica, DMLB, Wetzlar
Gefrierschrank	Premium no frost, Liebherr, Schweinfurt
Grobwaage	LS 2000, Ohaus, Gießen
Kamera für digitale Fotos	Color View 12, Olympus Biosystems, Hamburg
Kühlschränke	Profi-line, Liebherr, Schweinfurt
Linearbeschleuniger Primus M	6 MV, Dosisleistung 2 Gy/min, Siemens, Concord, CA, USA
Magnet-Heizrührer	Typ MR 3001, Heidolph Elektro GmbH, Keilheim
Mikroskop	Leitz DM IL, Leica, Bensheim
Mikrowelle	Quickchef 650, Moulinex, Köln
Objekträger für Comet-Assay	Plain white 2958TR; Richardson Supply Company Ltd., London, GB
Bildverarbeitungssoftware	Analysis Soft Imaging GmbH, Stuttgart
Quecksilberdampflampe	Photo optic lamp, HBO 50W/AC, Osram
Spannungsgerät	EPS 300, Pharmacia Biotech, Elektrophoresis Power Supply, Freiburg
Sterilbank	Hera safe, Heraeus, Hanau
Vortex	GLW - Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Wasserbad	GFL 1083; Memmert GmbH, Schwabach
Zählkammer	Neubauer improved, Marienfeld
Zentrifuge	Megafug 1.OR, Heraeus sepatech, Nürnberg
Zytospin-Filter	2589D, Schleicher u. Schuell, Dassel
Zytospin-Zentrifuge	Laborfuge 1, Heraeus Christ, Hanau

7.5 Lösungen und Puffer

7.5.1 Kolonietest

Fixativ

Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1,

Herstellung einen Tag vor dem Versuch, Kühlung auf -20 °C

Kristallviolett-Färbelösung (0,6%)

0,6% Crystal Violet

Herstellung: 3 g / 500 ml H₂O_{dest}

7.5.2 Mikrokern-Assay

Cytochalasin B

1mg Cytochalasin B in 1 ml DMSO lösen, davon 50 µl in 10 ml Medium

(Endkonzentration in der Kulturflasche: 5 µg / ml)

Sörensen-Puffer

500 ml 0,066 M NaH₂PO₄ (9,372g NaH₂PO₄ Anhydrat in 1 l H₂O_{dest})

500 ml 0,066 M KH₂PO₄ (8,983g KH₂PO₄ Anhydrat in 1 l H₂O_{dest})

Einstellung auf pH 6,8; Autoklavierung

Acridine Orange-Färbelösung (0,0063%)

Stammlösung: 200 mg Acridine Orange gelöst in 200 ml H₂O_{dest}

sterile Filtrierung, lichtgeschützte Aufbewahrung im Kühlschrank

Färbelösung: 4,5 ml Acridine Orange-Stammlösung mit 67,5 ml Sörensen-Puffer

7.5.3 Comet-Assay

Lysepuffer pH 10

2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA; 10 mM Tris; 1% NaSarcosinat

Herstellung: 146,11 g NaCl
37,23 g Na₂EDTA (MG=372.2) · 2H₂O
1,21 g TRIZMA Base (MG=121.1)
10 g NaSarcosinat (MG=293.4)
7,9 g NaOH-Plätzchen

ad 1 l H₂O_{dest}; Einstellung von pH 10 mittels 5 M NaOH Lösung

Lysepuffer-Gebrauchslösung

89% Lysepuffer; 1% Triton X-100; 10% DMSO; immer frische Zubereitung

Herstellung: 200 ml Lysepuffer pH 10
22 ml DMSO
2 ml Triton X-100

High Melting Agarose (HMA) 0,9%

360 mg Agarose (MEEO) + 40 ml PBS

Aufkochen in Mikrowelle

Low Melting Agarose (LMA) 0,6%

60 mg Agarose Low Melt + 10 ml PBS

Aufkochen in Mikrowelle, Abkühlung auf 37 °C im Wasserbad

Elektrophoresepuffer pH14

Stammlösungen: 5 M NaOH (200 g / 1 l H₂O_{dest})
200 mM Na₂EDTA pH 10 (74,46 g / 1 l H₂O_{dest})
Gebrauchslösung: 60 ml NaOH, 5 ml Na₂EDTA pH 10 ad 1 l H₂O_{dest}

Neutralisationspuffer

400 mM Tris mit pH 7,5

Herstellung: 48,44 g TRIS

ad 1 l H₂O_{dest}; Einstellung von pH 7,5 mit 9% HCl

Propidiumjodid-Färbelösung

100 µl Propidiumjodid-Stammlösung (1 mg / ml) auf 10 ml PBS

pro Objektträger 80 µl

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Flentje für die Ermöglichung einer Dissertation an der Klinik für Strahlentherapie und die Überlassung des Themas bedanken. Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. H. Stopper für die Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. T. Djuzenova für die immer nette und zuvorkommende Betreuung während der Entstehung der Arbeit, sowie für ihre stets rasche und kompetente Beratung.

Allen Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung bei den praktischen Versuchen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch herzlich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mir stets motivierend zur Seite standen.

Lebenslauf

Vorname und Familienname: Birgit Müller
Geburtsdatum: 18. Dezember 1978
Geburtsort: Salzkotten
Familienstand: ledig

Schulbildung

August 1985 - Juli 1989 Grundschole St. Bonifatius, Paderborn
August 1989 - Juni 1998 Reismann-Gymnasium, Paderborn
Juni 1998 Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife

Studium der Humanmedizin

November 1998 - 2004 Studentin der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
September 2000 Ärztliche Vorprüfung
September 2001 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
September 2003 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
November 2004 Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

März 2001 Chirurgische Klinik, Brüderkrankenhaus St. Josef, Paderborn
März 2002 Dr. med. Herber, Facharzt für Innere Medizin, Paderborn
Juli 2002 Orthopädische Klinik, Malteser Krankenhaus St. Franziskus-Hospital, Flensburg
September 2002 Klinik für Strahlentherapie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Februar 2003 Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, St. Johannisstift, Paderborn

Praktisches Jahr

Oktober 2003 - Februar 2004	Gynäkologie und Geburtshilfe, LKH Missions- ärztliche Klinik, Würzburg
Februar 2004 - Mai 2004	Innere Medizin, LKH Missionsärztliche Klinik, Würzburg
Mai 2004 - September 2004	Chirurgische Klinik, GZO Spital Wetzikon, Schweiz

Musikalische Ausbildung

1986 - 1998	Violin- und Klavierunterricht in Paderborn
seit 1990	ständige Mitarbeit in verschiedenen Orches- tern und Kammermusikensembles in Pader- born und Würzburg, Konzertreisen durch Deutschland, England, Frankreich, Ungarn und Griechenland

Würzburg, Januar 2005